

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA**

**FACULTAD DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**Departamento Académico de Ciencia y Tecnología e Ingeniería de los**

**Alimentos**



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA YEMA  
TERMINAL DE GUANÁBANA (*Annona muricata* L.) EN TRES  
NIVELES DE ALTITUD DE LA PROVINCIA DE LEONCIO PRADO**

**TESIS**

Para Optar el Título de:

**INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**VISITACIÓN JUSTO CARRIÓN ROQUE**

**PROMOCIÓN 2007- II**

**Tingo María – Perú**

**2008**

F 60

C26

Carrión Roque, Visitación J.

Evaluación de la Actividad Antioxidante de la Yema Terminal de Guanábana (*Annona Muricata* L.) en tres Niveles de Altitud de la Provincia de Leoncio Prado. Tingo María, 2008

103 h.; 15 cuadros; 12 gráficos; 17 anexos; 100 ref.; 30cm

Tesis (Ing. Industrias Alimentarias) Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María (Perú). Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias.

ANNONA MURICATA L. / ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE/ YEMA TERMINAL / COMPOSICION FISICOQUIMICA / EVALUACION/ TINGO MARIA / RUPA RUPA / LEONCIO PREADO / HUANUCO / PERU.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA**  
**Tingo María**  
**FACULTAD DE INGENIERIA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**  
Av. Universitaria s/n. Teléfono (062) 561385 – Fax (062) 561156  
Apart. Postal 156 Tingo María E.mail: fia@unas.edu.pe

### ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos en acto público el 16 de diciembre de 2008, a horas 5:00 p.m. en la Sala de Audiovisuales de la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada en la ciudad de Tingo María, Provincia de Leoncio Prado, Departamento de Huánuco, para calificar la tesis presentado por el Bach. **Visitación Justo, CARRION ROQUE**, titulado:

#### **“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA YEMA TERMINAL DE GUANÁBANA (*Annona muricata L.*) EN TRES NIVELES DE ALTITUD DE LA PROVINCIA DE LEONCIO PRADO”**

Después de haber escuchado la sustentación, las respuestas a las preguntas formuladas, lo declaran aprobado con el calificativo de **Bueno**, en consecuencia el Bachiller, queda apto para recibir el título de **Ingeniero en Industrias Alimentarias** del Consejo Universitario, de conformidad con el Art. 22º de la Ley Universitaria 23733; los artículos 51º y 52º del Estatuto Actualizado de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

Tingo María, 06 de enero de 2009

  
.....  
**Ing. Lauriano Zavaleta De la Cruz**  
Presidente

  
.....  
**Ing. Alipio A. Ortega Rodríguez**  
Miembro

  
.....  
**Ing. Jhony W. Vargas Solórzano**  
Miembro

  
.....  
**Dra. Elizabeth S. Ordóñez Gómez**  
Asesora

## **DEDICATORIA**

**A DIOS**, por brindarme la vida y permitirme salir adelante en los momentos más difíciles de mi vida personal, familiar, y así poder tener la oportunidad de cumplir con mis deseos de superación.

### **A mis queridos padres:**

A mis padres por haberme inculcado el esfuerzo y por apoyarme siempre: Teodoro Carrión y María Roque.

### **Mis hermanos:**

Con mucho cariño para ustedes y decirles que nada es imposible en esta vida que siempre estuvieron allí: Juan, Amancio, Anacleta, Pedro, Flor, Mario, Teodosio, Saturnino, Hilda, Marko y también para mis cuñadas Gregoria, Justina y Macaria.

### **A mis familiares:**

A mis tíos, tías, sobrinos, sobrinas, primos, primas; que significaron un estímulo para superarme y por sus consejos.

## **AGRADECIMIENTO**

- A la Universidad Nacional Agraria de la Selva, por permitir forjarme como profesional.
- A la Facultad de ingeniería en industrias alimentarias a sus trabajadores y a los profesores quienes me brindaron sus conocimientos dentro y fuera de las aulas durante mi formación profesional.
- A mi asesora, Dra. Elizabeth Ordoñez Gómez, por su amistad, confianza, dedicación y apoyo en todo momento, hasta concluir el trabajo.
- Al Dr. Manuel Sandoval Chacón, por su confianza y la responsabilidad de sacar adelante esta investigación.
- Al Dr. Tomas Menacho Mallqui, por su confianza y apoyo en los momentos que mas necesitaba sacar adelante esta investigación.
- A la Ing. Vanesa Melchor S., encargada del CIPNA, por su apoyo en las arduas horas de trabajo dentro del laboratorio.
- Al personal del laboratorio de la Universidad Nacional Agraria de la Selva por las facilidades brindadas en la ejecución de los ensayos preliminares de la presente investigación.
- A Oscar, Abel, Jenny, Sandra, mis amigos y amigas, quienes me apoyaron en la recolección de las muestras y con sus palabras de apoyo lograron motivarme para seguir con más ánimo la culminación de este trabajo.
- A los compañeros de trabajo que me motivaron para culminar este proyecto y poder seguir avanzando como profesional.
- A las personas que colaboraron de manera desinteresada con el estudio.

## ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Aspectos generales de la guanábana .....	3
2.1.1. Origen de la guanábana .....	3
2.1.2. Clasificación taxonómica.....	3
2.1.3. Descripción botánica.....	4
2.1.4. Composición química y valor nutricional .....	5
2.1.5. Formas de utilización de las frutas.....	6
2.1.6. Suelo .....	7
2.1.7. Clima .....	7
2.2. Antioxidantes .....	8
2.2.1. Aspectos generales de los antioxidantes .....	8
2.2.2. Tipos de antioxidantes .....	11
2.2.5. Polifenoles .....	14
2.2.6. Flavonoides .....	16
2.2.7. Catequinas.....	19
2.2.8. Vitamina C .....	21
2.3. Radicales libres. ....	22

2.3.1. Clasificación de radicales libres .....	24
2.3.2. Formación de radicales libres .....	25
2.3.3. Importancia biológica .....	26
2.4. Extracción de metabolitos secundarios .....	28
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	30
3.1. Lugar de ejecución .....	30
3.2. Materia prima.....	30
3.2.1. Rupa Rupa.....	30
3.2.2. Pumahuasi.....	31
3.2.3. Divisoria.....	31
3.3. Equipos, materiales y reactivos .....	32
3.3.1. Equipos de laboratorio .....	32
3.3.2. Materiales de laboratorio.....	32
3.3.3. Reactivos y solventes .....	33
3.4. Métodos de análisis .....	34
3.4.1. Caracterización fisicoquímica de la yema terminal.....	34
3.4.2. Cuantificación de vitamina C.....	36
3.4.3. Cuantificación de polifenoles .....	36
3.4.4. Evaluación de la actividad antioxidante.....	37
3.5. Metodología experimental.....	39
3.5.1. Preparación de la muestra .....	39

3.5.2. Caracterización de fisicoquímica.....	42
3.5.3. Cuantificación de vitamina C.....	42
3.5.4. Cuantificación de polifenoles .....	43
3.5.5. Evaluación de la actividad antioxidante.....	44
IV. RESULTADOS.....	47
4.1. Características fisicoquímicas de la yema terminal de guanábana.....	47
4.2. Cuantificación de vitamina C .....	48
4.2.1. Determinación de curva estándar de vitamina C.....	48
4.2.2. Contenido de vitamina C en la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica.....	49
4.2.3. Contenido de vitamina C por tipo de extracto.....	50
4.3. Cuantificación de polifenoles totales.....	51
4.3.1. Curva estándar de polifenoles .....	51
4.3.2. Contenido de polifenoles totales por unidad fisiográfica y método de extracción .....	52
4.3.3. Contenido de polifenoles totales por tratamiento .....	53
4.4. Actividad antioxidante de la yema terminal de guanábana .....	54
4.4.1. Coeficiente de inhibición del radical DPPH .....	54
4.4.2 Coeficiente de inhibición del radical peroxilo .....	56

V. DISCUSIÓN.....	58
5.1. Caracterización fisicoquímica de la yema terminal de guanábana.....	58
5.1.1. Humedad .....	58
5.1.2. Proteína .....	58
5.1.3. Grasa.....	59
5.1.4. Ceniza .....	59
5.1.5. Fibra .....	60
5.1.6. Carbohidratos .....	60
5.2. Contenido de vitamina C.....	62
5.2.1. Curva estándar de vitamina C.....	62
5.2.2. Contenido de vitamina C en la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica y método de extracción.....	63
5.2.3. Contenido de vitamina C por tratamientos. ....	64
5.3. Contenido de polifenoles totales.....	65
5.3.1. Determinación de la curva estándar de polifenoles.....	65
5.3.2. Contenido de polifenoles totales en la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica y método de extracción.....	66
5.3.3. Contenido de polifenoles totales por tratamientos.....	67
5.4. Actividad antioxidante de la yema terminal de guanábana .....	69

5.4.1. Coeficiente de inhibición del radical DPPH .....	69
5.4.2. Coeficiente de inhibición del radical peroxilo.....	74
VI. CONCLUSIONES .....	78
VII. RECOMENDACIONES.....	80
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
ANEXO .....	94

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Composición química de guanábana ( <i>Annona muricata L</i> ).....	5
2. Componentes químicos de la hoja de guanábana.....	6
3. Radicales libres.....	26
4. Análisis fisicoquímico de la yema terminal de guanábana.....	47
5. Determinación de la curva estándar de vitamina C.....	48
6. Contenido de vitamina C en la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica y método de extracción.....	49
7. Contenido de vitamina C en la yema terminal de guanábana.....	50
8. Determinación de curva estándar de polifenoles totales.....	51
9. Contenido de polifenoles totales en la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica y método de extracción.....	52
10. Contenido de polifenoles totales en la yema terminal de guanábana.....	53
11. Inhibición de radical DPPH (IC50) de la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica y métodos de extracción .....	54
12. Capacidad de inhibir radicales libres de DPPH (IC50) de la yema terminal de guanábana.....	55
13. Coeficiente de inhibición del radical peroxilo en la yema terminal de guanábana por unidad fisiológica y método de extracción.....	56

14. Coeficiente de inhibición del radical peroxilo de la yema terminal de guanábana.....	57
---	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Flujograma de operaciones para la preparación de la muestra de yema terminal de guanábana.....	40
2. Diseño experimental para evaluación Vitamina C, polifenoles totales y actividad antioxidante.....	46
3. Curva estándar de vitamina C.....	48
4. Contenido de vitamina C de la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica y método de extracción. ....	49
5. Contenido de vitamina C de la yema terminal de guanábana.....	50
6. Curva estándar de catequina para la cuantificación de polifenoles totales.....	51
7. Contenido de polifenoles de la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica y extracto.....	52
8. Contenido de polifenoles de la yema terminal de guanábana.....	53
9. Capacidad antioxidante de los extractos de la yema terminal de guanábana utilizando el test DPPH.....	54
10. Comportamiento del IC50 del radical DPPH de la yema terminal de guanábana.....	55

11. Coeficiente de inhibición del radical peroxilo de la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica y método de extracción.....	56
12. Coeficiente de inhibición del radical peroxilo de la yema terminal de guanábana.....	57

## ÍNDICE DE ANEXO

Contenido	Página
Cuadro de Absorbancia de la concentración de glucosa para la cuantificación de azúcares reductores.....	A-1
Análisis de varianza cuantificación de vitamina C (mg. Ácido ascórbico/ml muestra) de la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica por extractos.....	A-2
Análisis de varianza de vitamina C (mg. Acido ascórbico/ml muestra) de la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica y extracto acuoso .....	A-IIa
Análisis de varianza de vitamina C (mg. Acido ascórbico/ml muestra de la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica y extracto hidroalcohólico.....	A-IIb
Análisis de varianza de vitamina C (mg. Acido ascórbico/ml muestra) de la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica y extracto.....	A-III
Análisis de varianza cuantificación polifenoles totales (mg. cateq./ml muestra) de la yema Terminal de guanábana por unidad fisiográfica por extractos.....	A-IV

Análisis de varianza cuantificación polifenoles totales (mg. cateq. /ml muestra) de la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica y extracto acuoso.....	A-IVa
Análisis de varianza cuantificación polifenoles totales (mg. cateq. /ml muestra) de la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica y extracto hidroalcohólico.....	A-IVb
Análisis de varianza cuantificación polifenoles totales (mg. cateq. /ml muestra) de la yema terminal de guanábana por unidad Fisiográfica.....	A-V
Análisis de varianza del IC50 del radical DPPH de la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica por extractos (factorial).....	A-VI
Análisis de varianza del IC50 del radical DPPH de la yema Terminal de guanábana por unidad fisiográfica y extracto acuoso.....	A-VIa
Análisis de varianza del IC50 del radical DPPH de la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica y extracto hidroalcohólico.....	A-VIb
Análisis de varianza del IC50 del radical DPPH de la yema terminal de guanábana.....	A-VII
Análisis de varianza del IC50 del radical peróxilo de la hoja terminal de guanábana por unidad fisiográfica por extractos.....	A-VIII
Análisis de varianza del IC50 del radical peróxilo de la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica y extracto acuoso.....	A-VIIIa
Análisis de varianza del IC50 del radical peróxilo de la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica y extracto hidroalcohólico.....	A-VIIIb

Análisis de varianza del IC50 del radical peróxilo de la yema terminal  
de guanábana por unidad fisiográfica y extracto.....A-IX

## RESUMEN

La guanábana (*Annona muricata* L.) Crece en zonas tropicales del mundo y en la Amazonía peruana se cultiva con fines comerciales del fruto. El objetivo fue evaluar la actividad antioxidante de las yemas terminales de guanábana en tres niveles de altitud en la provincia de Leoncio Prado. Las hojas se recolectaron de tres niveles de altitud, Terraza alta (Ta), Colina baja (Cb) y Montaña alta (Ma). La preparación de la muestra consistió en: Recepción, blanqueo (ebullición/60seg), oreo (2h/ T° ambiente), secado (65°C/ 14horas), molienda ( $\varnothing=1\text{mn}$ ). El extracto acuoso consistió (10g hoja/300mL agua), se sometió a ebullición 45 minutos, para el extracto hidroalcohólico se preparó 10g hoja/300ml agua/etanol (50:50v/v), maceró 24h. Ambos se filtran y concentran a 50°C (reducir 60%v) en un rotavapor; Se evaluó la composición fisicoquímico de la yema terminal, contenido de vitamina C, polifenoles totales y la actividad antioxidante fue medido por (DPPH) y peroxilos. El análisis estadístico utilizado para el cálculo de los resultados fue (DCA) con arreglo factorial de 3x2 y la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ); se utilizó el software SAS 6.0. El mayor contenido de vitamina C fue  $0,890\pm 0,03$  mg AA/100mL de muestra, contenido de polifenoles totales fue  $80,330\pm 1,14$ mg Catequina/mL muestra y la mayor capacidad de inhibición del radical DPPH fue  $IC_{50}=84,610\pm 0,64$   $\mu\text{g/mL}$  que corresponde al extracto hidroalcohólico y Cb, la mejor capacidad de inhibir el radical peróxilo fue  $IC_{50}=11,375 \pm 0,02$   $\mu\text{g/mL}$ ) que corresponde al extracto hidroalcohólico y Ta .En conclusión las yemas terminales de guanábana poseen buena capacidad antioxidante y constituyen una fuente potencial para ser incorporados en formulaciones de nutracéuticos.

## I. INTRODUCCIÓN

En el país existen varios lugares donde se cultiva la guanábana (*Annona muricata* L.) desde el punto de vista de producción frutícola principalmente en los departamentos de Junín, Pasco, Ucayali, Madre de Dios y Huánuco, donde se puede encontrar a nivel de huertos familiares y en pequeñas parcelas. La producción comercial del cultivo de guanábana en el país circunscribe principalmente a atender la demanda del mercado nacional y la forma de procesamiento más común es en la elaboración de néctares, yogurt, jugos, helados y mermeladas.

Los recursos vegetales, son fuente importante de metabolitos primarios y secundarios con excelente actividad antioxidante que pueden contribuir con los sistemas de defensa; por esta característica, la guanábana es estudiada en relación a sus compuestos fitoquímicos, para determinar los principios activos que posee.

Naturalmente se comercializa la hoja de guanábana indicando que posee propiedades medicinales benéficas para la salud; como antiinflamatorio, anti cancerígeno y antimicrobiano, pero no existen publicaciones científicas que validen ésta propiedad. Hay diversos estudios sobre la *anonacina*, el compuesto que tiene la hoja de guanábana, que tendría efectos anticancerosos; por otro lado el conocimiento ancestral sobre la guanábana

referente a los recursos fitoterapéuticos y sus diversos usos en la sociedad deben ser evaluados y reevaluados, con el fin de conocer su potencial medicinal y en particular su poder antioxidante, cuyas propiedades deben ser revalidadas científicamente, con la finalidad de darle un mejor uso, con aplicaciones específicas. Por las asunciones expuestas se planteó en el presente trabajo de investigación los siguientes objetivos:

- Determinar la composición fisicoquímica de la yema terminal de la guanábana.
- Cuantificar el contenido de Vitamina C y polifenoles totales de la yema terminal de la guanábana en tres niveles de altitud.
- Determinar la actividad antioxidante de las yemas terminales de la guanábana medido por su capacidad de inhibir radicales libres, 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) y peróxido.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Aspectos generales de la guanábana

#### 2.1.1. Origen de la guanábana

La guanábana (*Annona muricata* L.) es una planta que crece en zonas tropicales del mundo. También es llamado como graviola o catuche (Brasil). Se han encontrado plantas en estado silvestre tanto en las Antillas como en diversos puntos de la Amazonia, por lo que el centro de origen puede ser compartido entre varios lugares. La presencia es principalmente como forma domesticada, lo que no facilita la precisión de la zona de origen. La guanábana fue cultivada por las culturas precolombinas en la costa peruana (CAVALCANTE, 1991).

#### 2.1.2. Clasificación taxonómica

Familia : *Annonaceae*.

Género : *Annona*

Especie : *Muricata*

Nombre científico : *Annona muricata* L.

Nombre común : "Guanábana"(español), graviola (Portugués), Soursop (ingles), corrosel (Francés) y Zuuzak (holandés) (BARAHONA, 1989).

### 2.1.3. Descripción botánica

Guanábana es un árbol imperecedero con hojas grandes, brillantes, verde oscuro. Produce una fruta grande, en forma de corazón y de color verde amarillo y tiene pulpa blanca. Graviola es indígena, la mayor parte de las áreas tropicales más calientes del sur y de Norteamérica, incluyendo la Amazonía. La fruta se vende en mercados locales en zonas tropicales, se llama guanábana en países de habla hispana y graviola en el Brasil. La pulpa de la fruta es excelente para hacer bebidas y los sorbetes (BARAHONA, 1989).

Se encuentra en amplia distribución, en la cual se han encontrado más de 50 *acetogeninas* con diferentes actividades biológicas presentes en frutos, corteza y hojas; identificándose 21 *acetogeninas citotóxicas* en las hojas (ARROYO *et al.*, 2005; QUISPE *et al.*, 2007).

Las especies de *Annona* se han propagado tradicionalmente por semilla y los métodos convencionales de propagación vegetativa son muy lentos. Debido a que las colecciones de estas plantas en el campo, generalmente están expuestas a plagas, enfermedades, problemas edáficos, climáticos y de espacio; el cultivo *in vitro* puede ser utilizado para establecer bancos de germoplasma y conservar así la diversidad necesaria para programas de fitomejoramiento (SANDOVAL y MULLER, 1989).

La guanábana es una fruta deliciosa de pulpa blanca, con tonos de frutas dulces y suave crema es habitual en los mercados tropicales, pero raramente se encuentra en otro lugar, por lo general entremezclan con 50-100 semillas negras (CAVALCANTE, 1991).

### 2.1.4. Composición química y valor nutricional

La fruta contiene 70,5% de pulpa; 10,8% de semillas y 18,7% de cáscara. La pulpa se caracteriza por su alto contenido de agua (67 a 85%) y de carbohidratos (13 a 26%), constituidos por almidón (3,7%), azúcares solubles (9,4%) y azúcares reductores (3,8%), entre otros. El contenido de proteína está entre 1 y 3% y no es una buena fuente de vitamina C. Tiene contenido variable en minerales (0,6 a 3,8% de ceniza), con 16, 37 y 0,2 mg de calcio, fósforo y hierro por 100 g de pulpa, respectivamente (CAVALCANTE, 1991).

#### 2.1.4.1. Componentes químicos de la yema terminal

Los componentes químicos se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Composición química de guanábana (*Annona muricata* L)

Componentes	Porcentaje	Cantidad
Humedad	%	80,6
Fibra	%	1,63
Cenizas	%	0,73
Grasa	%	0,31
Proteína	%	1,22
Almidón	%	1,62
Vitamina C	%	0,021
Azúcares (Glucosa, Fructuosa)	%	15,63
Potasio	mg	45,8
Magnesio	mg	23,9
Fósforo	mg	26,0
Hierro	mg	0,47

Fuente: BARRIGA, 1994

### 2.1.4.2. Componentes químicos de la hoja de guanábana

Los componentes químicos de la hoja de la guanábana se presentan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Componentes químicos de la hoja de guanábana.

Lactonas	Isoquinolinas	Lípidos
Annohexocina	Anonaine	Acido gentisico
Annomicina A, B, C y E	Anoniine	Acido lignoceric
Annomicina	Atherospermine	Acido linoleico
Annomicinas A, B y C	Corexemine	Acido estearico
Muricoreacina		
Gigantetronemina		
Muricoreacina A y C		
Javoricina		

Fuente: BARAHONA, 1989

### 2.1.5. Formas de utilización de las frutas

Al igual que las otras anonáceas, la guanábana se consume como fruta fresca, pero mayormente se utiliza en forma industrializada como helados, jugos y néctares. El sabor agridulce característico, así como su aroma, le confieren buena aceptación. En el Perú las variedades cultivadas en la Amazonia tienen preferencia para la industrialización por su mayor sabor agridulce, con relación a las variedades cultivadas con riego en la costa

desértica. En la medicina nativa se utiliza la corteza, raíz y hojas para producir té para la diabetes, como sedativo y como antiespasmódico. Las hojas y los frutos verdes son referidos como anti diarreicos y como productos astringentes, entre otros (CALDERÓN, 1992).

#### **2.1.6. Suelo**

Los suelos más adecuados son los profundos, de textura media, sin problemas de drenaje y con adecuado nivel de nutrientes. Las plantas sembradas en suelos deficientes en calcio y fósforo y con alta saturación por aluminio, generalmente no fructifican bien. Desarrolla mejor en suelos con pH mayor a 6,0. Es una planta que requiere bastante luminosidad; el exceso de sombra produce elongamiento y trastornos en el desarrollo de las plantas (VILLACHICA, 1996).

#### **2.1.7. Clima**

Crece en climas tropicales y subtropicales, pero no tolera las heladas; las temperaturas nocturnas menores a 12°C producen abortos florales, defoliaciones y muerte de brotes. Requiere precipitación pluvial mayor a 1000 mm/año, pero bien distribuida. Crece en zonas con 4000 mm de lluvia por año, y aunque desarrolla adecuadamente en zonas húmedas, no tolera las condiciones de mal drenaje. Durante la floración necesita de un período de estiaje, a fin de favorecer la fecundación de las flores; el exceso de lluvias en esta fase produce la caída de las flores (VILLACHICA, 1996).

## **2.2. Antioxidantes**

### **2.2.1. Aspectos generales de los antioxidantes**

Los antioxidantes son sustancia que a bajas concentraciones reduce, retrasa significativamente o previene la oxidación de un sustrato. Según (SIES, 1997), un antioxidante es una sustancia que en pequeñas cantidades puede inhibir la acción de un pro-oxidante (oxidante) en una reacción de oxidación.

Los antioxidantes son compuestos que inhiben o retardan la oxidación de otras moléculas mediante la inhibición de la propagación de la reacción de oxidación (MARTÍNEZ, 2000).

Los antioxidantes son sustancias que detienen o previenen una cadena de propagación oxidativo, mediante la estabilización del radical generado (radical libre). Nuestro organismo posee antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos para protegerse de estos radicales, sin embargo, otra fuente muy importante de ellos son las plantas y precisamente el estudio de estos compuestos es prioritario por su rol en la protección del cuerpo humano en contra de un número considerable de enfermedades degenerativas, las evidencias experimentales sugieren que protegen de manera importante las funciones biológicas de las células en contra de la actividad de los radicales libres (estrés oxidativo) (TREVIÑO *et al.*, 2006).

Un antioxidante se define como aquella sustancia que presenta en concentraciones muy pequeñas comparadas con las de un sustrato oxidable, disminuye o evita la oxidación del sustrato. En bioquímica puede considerarse como un donador de electrones capaz de evitar una reacción en cadena de

óxido-reducción. Los antioxidantes han sido clasificados de diferentes maneras, de las cuales las más utilizadas establecen las diferencias de acuerdo a la estructura química y función biológica, dividiéndolos en enzimáticos y no enzimáticos (HICKS *et al.*, 2006).

En el organismo existe un equilibrio natural entre el sistema de defensa antioxidativo, que puede ser de origen endógeno o exógeno y las especies reactivas de oxígeno. Cuando este equilibrio se rompe se habla de un estrés oxidativo debido a la ingesta deficiente en compuestos antioxidantes o a un exceso de especies oxigenadas reactivas. Es importante que una vez terminada la acción beneficiosa, el antioxidante gastado sea eliminado eficazmente para prevenir su interacción con otras sustancias (ZÚÑIGA, 2005).

Una gran parte lo componen los compuestos fenólicos que intervienen como oxidantes naturales de los alimentos, por lo que la obtención y preparación de alimentos con un alto contenido en estos compuestos, supone una reducción en la utilización de aditivos antioxidantes, la vez que se obtiene alimentos más saludables, que incluso pueden llegar a englobarse dentro de los alimentos funcionales (VASCONCELLOS, 2000).

Los recursos vegetales son fuente importante de metabolitos primarios y secundarios con excelentes actividades antioxidantes que pueden contribuir con los sistemas de defensa antioxidante (MUÑOZ, 2007).

Para equilibrar la respuesta oxidante el organismo dispone de una serie de sistemas antioxidantes que contrarrestan la generación de radicales libres (RL). Un antioxidante es una entidad química que a bajas concentraciones y en comparación con el oxidante, retarda o previene la

oxidación de un sustrato, el cual incluye a lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ADN (RAMOS *et al.*, 2006).

La capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento, consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical; la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración.

La capacidad antioxidante de una mezcla no viene dada solo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes; también depende del microambiente en que se encuentra el compuesto. Los compuestos interactúan entre sí pudiendo producirse efectos sinérgicos o inhibitorios. Por otra parte, es necesario considerar que los ensayos *in vivo* pueden presentar algunos inconvenientes, como la adaptabilidad en respuesta al aumento del estrés oxidativo (KUSKOSKI *et al.*, 2005).

Los antioxidantes cumplen un rol fundamental en la industria alimentaria al evitar la degradación química de los alimentos, conservando las propiedades organolépticas y alimentarias del alimento por largos períodos, minimizando el daño generado a las biomoléculas. Desde el punto de vista químico, la actividad antioxidante de los polifenoles presentes en los preparados naturales (flavonoides, flavonas, flavonoles, antocianos, etc.), está representada principalmente por su capacidad de atrapar radicales libres, especialmente del oxígeno (GORMAZ, 2005).

## **2.2.2. Tipos de antioxidantes**

### **2.2.2.1. Antioxidantes enzimáticos**

Las defensas antioxidantes consisten en evitar la reducción univalente del oxígeno mediante sistemas enzimáticos. Se han descrito un grupo de enzimas especializadas en inactivar por diferentes mecanismos a las ERO, como: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSH-Px), entre otras (HICKS *et al.*, 2006).

Las enzimas antioxidantes catalizan la desactivación selectiva de las especies reactivas generadas. Además, existen enzimas de degradación que eliminan aquellos componentes que las especies reactivas hayan alterado. El recambio celular por el cual las estructuras y los materiales alterados se eliminan y se re sintetizan de nuevo es capital para evitar la acumulación de material inservible, que podría generar graves disfunciones (TUR, 2004).

### **2.2.2.2. Antioxidantes no enzimáticos**

Algunos de los antioxidantes no enzimáticos son: el glutatión en su forma reducida (GSH), algunos minerales como selenio, zinc o vitaminas como riboflavina, ácido ascórbico (vitamina C) y  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), éstos son esenciales para la defensa contra el daño oxidante debido a que actúan como cofactores de las enzimas antioxidantes (HICKS *et al.*, 2006).

Los compuestos antioxidantes no enzimáticos son, entre otros, la vitamina E, la vitamina C, los carotenoides, diversos minerales y los polifenoles (TUR, 2004).

Los sistemas antioxidantes no enzimáticos están constituidos principalmente por un grupo de tres vitaminas: Vitamina C, Vitamina E y Betacaroteno y dos oligoelementos fundamentales el selenio y el zinc. Sus niveles de efectividad, ya que no se sintetizan en el organismo, dependen del equilibrio del propio consumo endógeno y de los aportes de la dieta (ZÚÑIGA, 2005).

### **2.2.3. Efectos benéficos**

Los antioxidantes ejercen acción en todos los procesos en los que se reduce la oxidación de radicales libres: 1) inhibición de radicales libres, 2) hidrólisis enzimático de enlaces esteres para remover ácidos grasos peróxidos de lípidos, 3) quelantes de iones metálicos de transición y 4) reducción de peróxidos por catálisis enzimático (THOMAS, 2000).

Desde el punto de vista nutricional, la actividad antioxidante, se asocia con su papel protector enfermedades cardiovasculares, cáncer, etc. y consecuentemente en los procesos de envejecimiento (VASCONCELLOS, 2000).

### **2.2.4. Antioxidantes de origen natural**

Los extractos naturales se han utilizado mayoritariamente con fines terapéuticos. Estos extractos están constituidos por diversos compuestos de diferente naturaleza química; polifenoles, isoprenoides, compuestos tiólicos, ácido ascórbico y polisacáridos que en conjunto contribuyen, bajo diferentes mecanismos, ejercer la capacidad antioxidante. La presencia y proporción de los preparados naturales, dependerá principalmente de la planta y solvente

utilizado en la extracción. Estos compuestos, además de su rol preservante del alimento, pueden actuar como antioxidantes biológicos en el consumidor, a través de diferentes mecanismos (GORMAZ, 2005).

- **Polifenoles** (flavonoides, catequinas, antocianidinas, etc.). Estos compuestos son oxidados por radicales libres ( $R\cdot$ ), dando lugar a un radical más estable y por lo tanto es menos reactivo.



Los flavonoides además, inhiben diversas enzimas responsables de la producción de anión superóxido; entre ellas la xantina-oxidasa, la ciclooxigenasa (COX), la succinoxidasa y la NADH oxidasa mitocondriales.

- **Ácido ascórbico**, se encuentra presente en muchas plantas y su acción antioxidante está dada por: a) su capacidad de secuestrar especies radical del oxígeno ( $O_2\cdot^-$ ,  $HO\cdot$ ,  $ROO\cdot$ ) y del nitrógeno ( $R\text{-NOO}\cdot$ ) y b) por su capacidad de proteger las defensas antioxidantes celulares; regenera las especies oxidadas de los antioxidantes fisiológicos ( $\alpha$ -tocoferol y GSH) y no fisiológicos ( $\beta$ -caroteno).
- **Isoprenoides**, son sustancias altamente liposolubles y por lo tanto se distribuyen en zonas de la célula con mayor lipofilicidad. Ellos actúan como antioxidantes, principalmente atrapando los radicales  $ROO\cdot$ . Además, algunos terpenoides de estructura semejante al ácido araquidónico inhiben la COX.
- **Polisacáridos**, estos compuestos en sus formas oligoméricas o poliméricas tienen la posibilidad de unirse a membranas biológicas a través de interacciones de puentes de hidrógeno o dipolares, provocando una

protección física que evita el contacto directo de los oxidantes con los componentes de dichas membranas. Un ejemplo de este tipo de interacciones está constituido por el efecto protector de los mucílago de la *Opuntia sp.*

- **Sustancias quelantes**, estos compuestos son en general ácidos carboxílicos y polifenoles; ellos quelan elementos trazas, principalmente cobre y hierro en su estado iónico, los cuales están involucrados en la producción de radicales libres vía la reacción de Haber Weiss / Fenton.
- **Compuestos tiólicos**. Existen algunas plantas que concentran particularmente compuestos tiólicos y muy fundamentalmente cisteína. Es reconocida la capacidad de estos grupos de atrapar radicales libres en forma similar a lo que ocurre con los compuestos fenólicos (GORMAZ, 2005).

## 2.2.5. Polifenoles

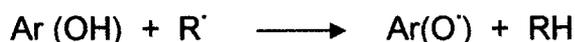
### 2.2.5.1 Definición

Los polifenoles son un grupo de sustancias químicas que se encuentran en las plantas y se caracterizan por la presencia de más de un grupo fenol por molécula. Estas moléculas son importantes para la fisiología de las plantas porque contribuyen a la resistencia a microorganismos e insectos y ayudan a preservar su integridad por su continua exposición a estresantes ambientales, incluyendo radiaciones ultravioletas y relativamente altas temperaturas. En el ser humano, parte de la actividad de los polifenoles se debe a su capacidad de formar parte del sistema antioxidante celular (ZHAO *et al.*, 1999).

La capacidad antioxidante de los polifenoles parece estar relacionado con su capacidad para quelar metales, secuestrar radicales libres, aunque en ocasiones, también pueden promover reacciones de oxidación "in Vitro". Destacan los flavonoides, los ácidos fenólicos, taninos, chalconas y curaminas por su conocida actividad antioxidante, quienes constituyen la fracción polifenólica de una gran diversidad de alimentos (MARTÍNEZ, 2000).

CÓRDOVA (2000), menciona que debido a su gran actividad antioxidante, estos ejercen efectos sobre el tratamiento y prevención del cáncer inflamatorio. Enfermedades cardiovasculares, anticancerígenas, antiinflamatorio, bactericida, estimuladores de la respuesta inmune, antialérgicos, antivirales, estrogénicos e inhibidores de la fosfolipasa 2A, de la ciclooxigenación, lipooxigenación, glutatión reductasa y xantina oxidasa. Que además inhibe daños contra el ADN de la célula, los flavonoides son compuestos fenólicos constituyentes de la parte no energética de la dieta humana. Se encuentran en vegetales, semillas, frutas y en bebidas como vino y cerveza. Se han identificado más de 5, 000 flavonoides diferentes, aunque los hábitos alimenticios son muy diversos en el mundo, el valor medio de ingesta de flavonoides se estima como 23 mg/día, siendo la quercetina el más predominante con un valor medio de 16 mg/día. En un principio, fueron consideradas sustancias sin acción beneficiosa para la salud humana, pero más tarde se demostraron múltiples efectos positivos debido a su acción antioxidante y eliminadora de radicales libres (MARTÍNEZ, 2000).

Estos compuestos son oxidados por radicales libres ( $R\cdot$ ), dando lugar a un radical más estable y por lo tanto, menos reactivo.



Los flavonoides además, inhiben diversas enzimas responsables de la producción de anión superóxido; entre ellas la xantina-oxidasa, la ciclooxigenasa (COX), la succinoxidasa y la NADH oxidasa mitocondriales (PIETTA, 2000).

Existen polifenoles con diversa capacidad antioxidante, por ejemplo, la catequina inhibe la oxidación catalizada por mioglobina cuando su concentración alcanza los 100mM mientras que la hipolactina y la gossipetina lo hacen a sólo 10mM (HERNÁNDEZ y PRIETO ,1999).

Los compuestos fenólicos son de gran importancia biológica y se encuentran presentes principalmente en frutas pero también en menor cantidad en hojas, flores y otros órganos vegetales. Estos compuestos están presentes en todos los tejidos de las plantas y frecuentemente forman los metabolitos secundarios más abundantes en frutas (VILLEGAS *et al.*, 2005).

#### **2.2.5.2. Clasificación de polifenoles**

Los polifenoles están subdivididos en: taninos hidrolizables (esteres de ácido gálico y otros azúcares); y fenilpropanoides (como ligninas, flavonoides y taninos condensados) y constituyen una fuente importante en los alimentos de nuestra diaria (ZHAO *et al.*, 1999).

#### **2.2.6. Flavonoides**

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. El organismo humano no puede

producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos, estas sustancias están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras y en diversas bebidas y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana (MARTÍNEZ *et al.*, 2002).

Son pigmentos hidrosolubles que se encuentran tanto en el citoplasma como en las vacuolas de las células vegetales, y que son los responsables de los colores intensos de las flores y frutas. La mayor parte de los flavonoides son derivados de la cromona (1,4-benzopirona). (MARTÍNEZ, 2005).

Los flavonoides se ubican principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas, apareciendo sólo rastros de ellos en las partes de la planta por encima de la superficie del suelo. Una excepción son los tubérculos de cebolla, que contienen una gran cantidad de quercetina 4'-D-glucósidos (MARTÍNEZ *et al.*, 2002).

Los flavonoides son compuestos polifenólicos naturales que están presentes en grandes variedades de vegetales, frutas y bebidas; y muchos son considerados como una fuente importante de antioxidantes, lo que pueden interactuar directamente con especies reactivas de oxígeno e inhibidores de la lipoperoxidación (GONZÁLEZ *et al.*, 2000).

#### **2.2.6.1. Clasificación de flavonoides**

Para su estudio sistemático los más de 4000 flavonoides naturales se han clasificado en varias clases de acuerdo con las variantes estructurales que presenta la cadena central C<sub>3</sub>. De acuerdo con esto los flavonoides se

clasifican en varios grupos: Chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, antocianinas, catequinas, epicatequina, auronas, isoflavonoides, pterocarpanos, carotenoides, etc. (MARTÍNEZ, 2005).

Los flavonoides más abundantes en la dieta son los flavonoles (catequinas, protoantocianidinas), las antocianinas y productos de oxidación de derivados de ellos. La fuente principal de polifenoles son; frutas y bebidas (zumos de fruta, vino, té, café, chocolate y cerveza) y menor cantidad verduras legumbres y cereales. La ingesta diaria de polifenoles en individuos que sigue una dieta rica en estos alimentos es aproximadamente 1g/ día (GONZÁLEZ *et al.*, 2001).

#### **2.2.6.2. Extracción de flavonoides**

La extracción de los diferentes flavonoides se realiza a partir del material fresco o incluso seco, siempre y cuando no se altere su composición. Se utilizan inicialmente disolventes no polares o ligeramente polares para separar las clorofilas gomas y agliconas de flavonoides altamente metoxiladas. Los flavonoides, que poseen un gran número de grupos hidroxilos insustituídos o azúcares, son considerados polares, por lo que son ligeramente solubles en disolventes polares, como el metanol, etanol, acetona o agua. El filtrado final se concentra y todo el disolvente se remueve, este proceso es favorable para la extracción de la mayoría de los flavonoides pero no para antocianidinas o flavonoides de baja polaridad los cuales aparecen en la superficie de las plantas (GARCÍA, 2007).

## **2.2.7. Catequinas**

### **2.2.7.1. Definición**

Las catequinas son los principales constituyentes de varios tipos de té, son mejores por su efecto antioxidativo, anticarcinógeno, antibiótica y hipertensión, las principales flavan 3- ols presentes en el té constituyen una mezcla de catequinas (CAT) entre ellas: epigalocatequina galato (EGCG), epigalocatequina (ECG), epicatequina galato (ECG) y epicatequina (EC) (MELCHOR, 2004).

El contenido de catequina en los tres tipos de té tiene el siguiente orden: te verde > oolong te > te negro, lo que tiene relación directa con la actividad de capturar radicales libres. Esto se debe a su contenido en catequinas (YAMAGUCHI *et al.*, 1998).

Algunas de las catequinas constituyen de 3 – 10 % del peso de té preparado (CAO y CAO, 2000).

### **2.2.7.2. Características de las catequinas**

Difieren ligeramente en su estructura química de otros flavonoides, pero comparten con ellos sus propiedades preventivas y son estables a temperatura ambiente.

La (+) catequina, la (-) epicatequina, la 7,8-dihidroxiavona y la rutina, secuestran el OH· generado en un sistema Fenton en un rango de 100 a 300 veces superior a los efectos del manitol, un típico secuestrador de esta ERO. El ensayo se efectuó a través de la determinación de ácido metanosulfónico formado por la reacción entre el dimetilsulfóxido y este radical (PÉREZ, 2003).

Son todos términos que encuadran a los derivados de los oligómeros o polímeros de la (+) catequina y (-) epicatequina. Abundan en las semillas y hollejos principalmente, aunque también pueden encontrarse en las hojas y raíces. Las antocianinas brindan el color rosa y rojo oscuro a las uvas, destacándose el malvidin-3-glucósido. Otros compuestos fenólicos que pertenecen al grupo de los estilbenos, entre los que destacan la fitoalexina, resveratrol y viniferinas, son los que se han reconocido como compuestos antimicrobianos que defenderían la planta del ataque de determinados gérmenes ( ZÚÑIGA, 2005).

Los taninos condensados o proantocianidinas, se conocen también como no hidrolizables, ya que se hidrolizan con dificultad y por el contrario, el tratamiento con calor y ácidos minerales origina polímeros de alto peso molecular (flobáfenos). Este tipo de taninos se producen en el metabolismo normal de los vegetales por lo que se consideran fisiológicamente y se encuentran ampliamente repartidos en el reino vegetal.

Químicamente se forman por condensación de catequinas o catecoles (flavonoles) con uniones directas C-C entre las moléculas, generalmente en 4—8 o en 4—6 y no contienen azúcares en su estructura, biogénicamente proceden del metabolismo de los flavonoides, se forman a partir de una flavanonas por hidroxilación en el C-3. Para algunos autores existe un tercer tipo de taninos, los florotaninos, que se han aislado de diversas especies de algas pardas y están constituidos por acoplamiento oxidativo únicamente de unidades de floroglucinol C-C y/o C-O (CARRETERO, 2005).

## **2.2.8. Vitamina C**

### **2.2.8.1. Definición**

La vitamina C es uno de los más poderosos reductores conocidos en los tejidos humanos. Es el principal antioxidante hidrosoluble, ejerce sus efectos benéficos fundamentalmente en los compartimientos acuosos de las células (DIPLOCK, 1991).

El ácido ascórbico puede actuar como un antioxidante hidrosoluble general, por ejemplo para reducir el tocoferol oxidado en las membranas y puede inhibir la información de nitrosamina durante la digestión. Así como también mantiene a muchos metales cofactores en estado reducido (MURRAY, 2001).

### **2.2.8.2. Acción de la vitamina C**

Otros antioxidantes como el beta caroteno y la vitamina C, también son efectivos secuestradores de radicales libres, protegiendo así contra enfermedades causadas por el estrés oxidativo (POLYAKOV *et al.*, 2001);

Los carotenoides eliminan los radicales peroxilo, sobre todo a una tensión baja de oxígeno, tal como se encuentra en el organismo. El licopeno es uno de los antioxidantes carotenoides más potentes. La forma reducida de la coenzima Q, el ubiquinol 10, es muy efectivo como eliminador de radicales peroxilo lipídicos, pudiendo funcionar también como regenerador de la vitamina E oxidada (GEY *et al.*, 1987).

### 2.3. Radicales libres.

Los radicales libres son átomos o moléculas que contienen uno o más electrones desapareados; son químicamente inestables, altamente reactivos y pueden causar severas lesiones a los tejidos vivos. El daño que radicales libres pueden causar a los sistemas biológicos deriva de su habilidad para generar perturbadores reacciones químicas en cadena, en su intento por recobrar la estabilidad de los electrones (REILLY y BULKEY, 1990).

Según CABREJOS y CÓRDOVA (2000), los radicales libres son moléculas inestables (perdieron electrón) y altamente reactivos. Su misión es la de remover el electrón que les falta, de las moléculas que están a su alrededor para obtener su estabilidad. La molécula atacada (que ahora no lo tiene un electrón) se convertirá entonces en radical libre y de este modo se inicia una reacción de cadena que dañará muchas células y puede ser indefinida si los antioxidantes no intervienen.

La mayoría del oxígeno usado en respiración (95%) es utilizado a nivel mitocondrial, pero un pequeño porcentaje (1-3%), origina especies reactivas de oxígeno (radicales superóxidos, hidroxilo, peroxilo, etc.). Los radicales libres se forman como consecuencia natural del metabolismo oxidativo en los humanos, por acción de enzimas tipo oxidasas e hidrolasas, así como por efecto de radiaciones, contaminación ambiental (ZÚÑIGA, 2005).

Los procesos de oxidación producen radicales libre que pueden interferir en los procesos normales y dañar las células corporales causando estrés oxidativo. El estrés oxidativo, se define como el desbalance entre la producción de radicales libres y cantidad de antioxidante presentes en el

ambiente. Es la pérdida de equilibrio entre pro oxidación y antioxidación a favor de los prooxidantes (ELEJALDÉ, 2001).

Los radicales libres del oxígeno se forman continuamente en el organismo por el metabolismo normal, siendo eliminados por las defensas antioxidantes. Cuando son producidos en exceso pueden ocasionar una lesión tisular, por cuyo motivo han sido implicados en muchas enfermedades. Se insiste también sobre la importancia de la defensa antioxidante, cuya función es prevenir la oxidación, ya sea eliminando las especies reactivas del oxígeno tales como el radical superóxido, el radical hidroxilo o el peróxido de hidrógeno, previniendo su formación (KORC *et al.*, 1995).

Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye nuestras células. La vida media biológica del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a moléculas, membranas celulares y tejidos (AVELLO y SUWALSKY, 2006).

Un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres mediante la liberación de electrones en nuestra sangre, los que son captados por los radicales libres. El problema para la salud se produce cuando nuestro organismo tiene que soportar un exceso de radicales libres durante años, producidos mayormente por contaminantes externos, que provienen principalmente de la contaminación atmosférica y el

humo de cigarrillos, los que producen distintos tipos de radicales libres en nuestro organismo (AVELLO y SUWALSKY, 2006).

### **2.3.1. Clasificación de radicales libres**

#### **2.3.1.1. Radicales libres inorgánicos o primarios**

Se originan por transferencia de electrones sobre el átomo de oxígeno, representan por tanto distintos estados en la reducción de este y se caracterizan por tener una vida media muy corta; estos son el anión superóxido, el radical hidroxilo y el óxido nítrico (VENEREO, 2002).

#### **2.3.1.2. Radicales libres orgánicos o secundarios**

Se pueden originar por la transferencia de un electrón de un radical primario a un átomo de una molécula orgánica o por la reacción de 2 radicales primarios entre sí, poseen una vida media un tanto más larga que los primarios; los principales átomos de las biomoléculas son: carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre (VENEREO, 2002).

#### **2.3.1.3. Intermediarios estables relacionados con los radicales libres del oxígeno**

Aquí se incluye un grupo de especies químicas que sin ser radicales libres, son generadoras de estas sustancias o resultan de la reducción o metabolismo de ellas, entre las que están el oxígeno sínglele, el peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, peroxinitrito y los hidroperóxidos orgánicos (VENEREO, 2002).

### 2.3.2. Formación de radicales libres

Los sistemas biológicos producen radicales libres mediante diversas reacciones, procesos exudativos normales dentro de las células. Fuentes exógenas incluyen a los efectos de la radiación ionizante sobre las moléculas orgánicas y a la degradación térmica de la materia orgánica (como la combustión de tabaco). La energía proveniente de estas fuentes puede romper uniones químicas para formar radicales. Los radicales también pueden producirse por reacciones de redox (reducción- oxidación) que incluye la transferencia de un electrón catalizado por medio de varios iones metálicos o por enzimas (DIPLOCK, 1991).

Los radicales libres son moléculas que se derivan del oxígeno, están en continua formación en las células del organismo y en pequeñas cantidades no producen efectos tóxicos. En situación normal la producción de radicales libres es constante en una concentración determinada, y son neutralizados por antioxidantes, estas pueden ser sustancias propias del organismo (enzimas antioxidantes) o pueden ser sustancias que vienen con los alimentos (la vitamina C, A, Beta caroteno, flavonoides, etc.) (GONZÁLEZ *et al.*, 2000).

El consumo de aceites vegetales hidrogenados tales como la margarina y el consumo de ácidos grasos *trans* como los de las grasas de la carne y de la leche también contribuyen al aumento de los radicales libres (AVELLO y SUWALSKY, 2006).

Los radicales libres son entidades químicas que tienen un electrón desapareado o no compartido. A causa de estos electrones los radicales libres

son algo inestables, o sea, son de vida corta; también son altamente reactivos por el hecho de que, para conseguir su estabilidad química, tratan de perder o ganar un electrón. Así, estas sustancias son muy propensas a interaccionar con muchas moléculas, como los lípidos de membranas y el ADN, dañándolas a menudo irreparablemente. Los radicales libres se forman en diversos procesos químicos, físicos y enzimáticos, ningún tejido o célula esta inmune al ataque de estos compuestos (ZÚÑIGA, 2005).

### 2.3.3. Importancia biológica

Una gran variedad de procesos metabólicos derivan de la producción de radicales libres y compuestos reactivos de oxígeno (REILLY y BULKEY, 1990).

Las fórmulas y radicales libres reportados por REILLY y BULKEY se indican en el cuadro 3.

Cuadro 3. Radicales libres

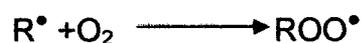
Fórmula	Radical
$O_2^\bullet$	Anión de radical súper oxido.
$OH^\bullet$	Radical hidroxilo.
$ROO^\bullet$	Radical peróxido.
$^1O_2$	Oxígeno singlete*
$H_2O_2$	Peróxido de hidrogeno*

(\* Considerados radicales libres por su alta reactividad química.

Fuente: REILLY y BULKEY, 1990.

- **Radical peroxilo ROO<sup>•</sup>.**

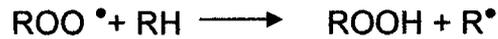
Son los radicales más abundantes en los sistemas biológicos. Se originan a partir de la adicción de oxígeno a prácticamente cualquier radical hidrocarbonatado. Se forman como intermediarios durante la ruptura de los lípidos peroxidados en las reacciones de la peroxidación lipídica. La formación de ROO<sup>•</sup> es el paso más importante de las reacciones de propagación en cadena durante la peroxidación lipídica. Tal como se presenta en el cuadro 4. La peroxidación lipídica de la membrana produce alteraciones de las funciones secretoras y de los gradientes iónicos. Numerosos residuo químicos de esta reacción puede difundir del sitio donde se producen y provocar edema, estimular fosfolipasa A<sub>2</sub>, inducir la liberación de ácido araquidónico con lo consiguiente formación de eicosanoides.



Es un radical más fuerte que el anión superóxido, capaz de atravesar las membranas celulares e iniciar la peroxidación de los ácidos grasos de los fosfolípidos (HALLIWELL, 1989).

La acción antioxidante de los carotenoides consiste en reaccionar con radicales peroxilo para formar otro radical menos reactivo que, por su parte, podrá reaccionar con otro radical peroxilo y dar lugar a un compuesto no reactivo (TUR, 2004).

La Cadena de reacciones en el proceso de lipoperoxidación según GONZALES *et al.*, 2000, es la siguiente:



RH- Acido poli-insaturado.  $\text{R}^\bullet$  - Radical lipídico.  $\text{ROO}^\bullet$ - Radical peróxilo

$\text{ROOH}$  - Radical hidroperóxido.  $^\bullet\text{OH}$  - Radical hidroxilo

#### 2.4. Extracción de metabolitos secundarios

Extractos polares es debida, en parte, a la presencia de sustancias con grupos hidroxilos, los cuales ejercen su acción por donación de protones (capacidad secuestrante de radicales libre), o bien por interacción, adición o combinación de radicales o por reacciones redox (transferencia de electrones). Es importante la estructura planar y espacial del compuesto antioxidante presente en el extracto. Los extractos etanólico y acuoso de la corteza mostraron la mayor cantidad de fenoles, la planta puede ser considerada una buena fuente de antioxidantes naturales, que podrían contrarrestar el exceso de radicales libres y así ejercer las propiedades terapéuticas atribuidas, más que actuar como hipoglicemiante (MURILLO *et al.*, 2007).

Los extractos de hojas de Ginkgo biloba, una de las más antiguas fitomedicinas, se utilizan corrientemente con fines terapéuticos. Sus principales aplicaciones están relacionadas con las enfermedades de la tercera edad, como insuficiencias cerebro vasculares y de circulación periférica y desórdenes de la memoria. Los extractos de Ginkgo ricos en flavonoides y

terpenoides, son muy efectivos frente a los radicales libres, mostrando una alta actividad antioxidantes y de protección frente a los daños causados por éstos (NAVARRO *et al.*, 2006).

Los extractos de las plantas fueron obtenidos de dos maneras: la primera utilizando material fresco macerado con agua destilada estéril en mortero estéril en proporción 1:3 P/V, y para la segunda material vegetal seco colocado en agua caliente a manera de infusión en una proporción de 1:6 P/V. Todos los materiales se filtraron y se colocaron en recipientes de vidrios oscuros estériles, hasta su utilización para las pruebas (MASELLI *et al.*, 2006)

Las condiciones óptimas de extracción de los compuestos activos fueron similares para todos los vegetales estudiados (30-45 min, 75-100°C). Se encontró una correlación entre el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante de los extractos (NAVARRO *et al.*, 2006).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Lugar de ejecución**

El presente trabajo se desarrolló en los laboratorios del Centro de Investigación de Productos Naturales de la Amazonia (CIPNA) y en los laboratorios de: Nutrición Animal y Tecnología e Industrias Cárnicas de la Universidad Nacional Agraria de Selva, ubicada en la ciudad de Tingo María, distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco, región Andrés Bello Cáceres, situada a 660 msnm, con una humedad relativa promedio anual de 84% y temperatura promedio anual de 24 °C.

El estudio se llevó a cabo entre los meses de marzo a setiembre del 2008.

#### **3.2. Materia prima**

Yemas terminales de guanábana recolectados de los huertos familiares y cultivos agrícolas de tres unidades fisiográficas, cuyas condiciones climáticas se describen a continuación.

##### **3.2.1. Rupa Rupa**

Situado a 650 m.s.n.m. con una humedad relativa promedio de 84% y una temperatura promedio anual de 24°C; las precipitaciones pluviales

pasan de 3000 mm y casi no hay un sólo mes al año sin lluvias; es una unidad fisiográfica de Terraza alta (Ta).

### **3.2.2. Pumahuasi**

Situado a 800 m.s.n.m. con una humedad relativa promedio de 84%, con temperaturas medias entre 22 y 25°C, la precipitación promedio anual es de 3200 a 3800 mm, con épocas marcadas comprendida entre noviembre y mayo de abundantes lluvias; es una unidad fisiográfica de Colina baja (Cb).

### **3.2.3. Divisoria**

Situado a 1600 m.s.n.m. con una humedad relativa promedio de 85 a 95%, presenta una temperaturas media anual de 20°C, la precipitación promedio anual es de 3200 a 3800 mm, con una época lluviosa entre los meses de octubre y abril; Es una unidad fisiográfica de Montaña alta (Ma).

Se colectaron las muestras por cada unidad fisiográfica, en forma manual en las mañanas y en las tardes, cuidando que la radiación solar no fuera muy intensa; evitándose que las yemas recolectadas se pardeen. Las muestras fueron colocadas en bolsas de papel y luego trasladadas al laboratorio. Así mismo después de su extracción fueron envasados en bolsas conteniendo 1000 ml cada bolsa sellada herméticamente hasta su posterior análisis.

### **3.3. Equipos, materiales y reactivos**

#### **3.3.1. Equipos de laboratorio**

- HPLC (Shimatzu Scientific, MD, USA.), equipado con: Bomba modelo LC-10ATVP, columna PHENOMENEX GEMINI/C-18/110A/5 $\mu$ m/250X46,0MM, horno de columna modelo CTO - 10 AS VP, detector UV-VIS modelo SPD-10AVVP, controlador modelo SCL-10AVP y un Inyector de muestra de capacidad de 20  $\mu$ L.
- Balanza analítica digital, sensibilidad  $\pm 0,0001$ g. U.S.A. marca Sartorius.
- Equipo digestor de proteína marca BUICHI digest automat K-438.
- Espectro termo electrón corporation modelo genesys-6. (UV/Vis)
- Mufla con temperatura regulable de 0 a 1200°C marca linn.
- pH metro marca ATC.
- Refractómetro de mano marca ATAGO HSR - 500.
- Estufa ODHG-9240A TOMOS.
- Vortex marca Genie 2 Scientific Industries.
- Centrífuga marca Hettich – modelo MIKRO 22R y velocidad 10000 rpm.
- Desionizador de agua Easy Pure II RF/UV.
- Baño María modelo YCW-OLOE GEMMYCO.
- Rota vapor modelo R-300.

#### **3.3.2. Materiales de laboratorio**

- Campana de desecación.
- Crisoles de porcelana, tubos de ensayo y espátulas.
- Buretas de 10 mL.
- Fiolas de 25, 50, 100, 500 y 1000 mL.

- Pipetas graduadas de 2, 5 y 10 mL.
- Espátulas.
- Gradillas.
- Micropipetas de 10 – 100  $\mu\text{L}$  y de 100 –1000  $\mu\text{L}$ .
- Probetas de 10, 100 y 500 mL.
- Vasos de precipitado de 50, 100, 250, 500 y 1000 mL.
- Cubetas de poliestireno (1 cm x 1 cm x 4,5 cm).
- Microtubos.
- Microjeringa (50  $\mu\text{L}$ ).
- Filtro de membrana 0,2  $\mu\text{m}$  marca GELMAN.
- Tubos de ensayo de 1,5 x 10 cm

### 3.3.3. Reactivos y solventes

- Ácido clorhídrico (HCl) Q.P.
- Hidróxido de sodio (NaOH) Q.P.
- Etanol al 95%.
- Ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) Q.P.
- Ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ).
- Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).
- Fenolftaleína solución alcohólica al 1%.
- Mezcla catalítica: sulfato de cobre y sulfato de potasio.
- 1,1 diphenyl-2-picryl hidrazil (DPPH).
- 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfónico) ( $\text{ABTS}^+$ ).
- 2,2 – azobis(2 – amidopropano) hidrocloreto (ABAP).
- Carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ).

- (+)- catequin 1mM.
- Solución de fenol de Folin- Ciocalteu.
- Cloruro de sodio (NaCl) Q.P.
- Fosfato de sodio hepta hidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) Q.P.
- Fosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) Q.P.
- L (+) ácido ascórbico Q.P.
- Metanol para HPLC.

### 3.4. Métodos de análisis

#### 3.4.1. Caracterización fisicoquímica de la yema terminal

Se utilizaron los siguientes métodos de análisis:

- **Sólidos solubles**, Método N°945.80: (AOAC, 1997). Tomando 10 ml de cada extracto acuoso e hidroalcohólico.
- **pH**, Método N°973.193 (AOAC, 1964).
- **Humedad**: Método N°23.003 (AOAC, 1997).
- **Ceniza**: Método N°942.50, calcinación directa (AOAC, 1997).
- **Fibra**: Método N° 930.20 (AOAC, 1997).
- **Carbohidratos**: Por diferencia de los demás componentes del análisis químico proximal (HART y FISHER, 1991).
- **Grasa**: Método de 930.20 (AOAC, 1997).
- **Proteína**: Método N° 991.29 (AOAC, 1997).
- **Azúcares totales y reductores**: Según Método ácido 3,5 – dinitro salicílico (ASQUERI, 2008). Se preparó una solución estándar disolviendo y diluyendo 540 mg de glucosa a un volumen exacto de 100 mL con agua

destilada, de esta solución se retiraron alícuotas de 0,3 – 0,5 – 0,8 – 1,0 mL y se transfirió a cada tubo de ensayo de 1,5 x 10 cm previamente enumerados, se adicionó 2,0 mL de ADNS en 1,9 – 1,7 – 1,4 – 1,2 mL, de agua destilada respectivamente para que todos tengan un volumen final de 4,2 mL. Así mismo se preparó el blanco con 2,2 mL de agua destilada y 2,0 ml de ADNS. Se agitó y se llevó a ebullición por 6 minutos, se enfrió en agua y se leyó la absorbancia en espectrofotómetro regulado a 540 nm.

De la misma forma se prepararon para las muestras con y sin hidrólisis: se pesó 10 g de hoja seca y molida se transfirió con agua destilada a una fiola de 100 mL y se aforó, luego se calentó hasta ebullición, se filtró con 0,1g de acetato de plomo, luego se retiró 5 mL de la solución filtrada a una fiola de 100 mL. De ésta solución se retiraron alícuotas de 0,5 mL y se transfirió a cada tubo de ensayo previamente enumerados, se adicionó 2,0 mL de ADNS y 1,7 mL de agua destilada, respectivamente, para obtener un volumen de 4,2 mL, se agitó los tubos y se llevo a ebullición por 6 minutos, se enfrió en agua y se leyó la absorbancia en espectrofotómetro a 540 nm.

Para la preparación de las muestras con hidrólisis: se pesó 5 g de hoja molida se transfirió con agua destilada a una fiola de 50 mL y se completó con la misma agua, se llevó a ebullición, se filtró con 0,1 g de acetato de plomo, luego se tomó 5 mL de la solución filtrada transfiriéndose a un tubo de ensayo (1,5x10 cm), se adicionó 0,3 mL de HCl, se llevó a baño maría a 60°C/10minutos, seguidamente se neutralizó con 0,6 mL de NaOH 6N, se enfrió en agua corriente, se transfirió a una fiola de 50 mL y se enrazó. Se retiró una alícuota de 0,3 mL de solución filtrada y se transfirió a cada tubo

de ensayo previamente enumerada, se colocó 2,0 mL de ADNS y 1,9 mL agua destilada respectivamente, para obtener un volumen de 4,2 mL, se agitaron los tubos, se llevó a ebullición por 6 minutos, se enfrió en agua y leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a 540 nm.

### 3.4.2. Cuantificación de vitamina C

Se utilizó el método de cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de ácido ascórbico y deshidroascórbico de las frutas y hortalizas (GÖKMEK *et al.*, 2000). Se preparó 1 litro de fosfato de potasio monobásico a 0,2M ajustado a pH = 2,4 con ácido ortofosfórico y 10 mL de solución estándar de ácido ascórbico de concentración 2,5 mg/mL con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> microfiltrada. A partir de la solución estándar se prepararon soluciones diluidas de 1, 3, 10, 20, 30, 40 y 50 µg/mL, se homogenizó, se filtró sobre el filtro de membrana 0,2 µm, seguidamente se inyectó al equipo HPLC, 20 µL de cada solución y las lecturas se realizaron cada 15 minutos a una longitud de onda 254nm. Para el cálculo de los resultados se utilizó la expresión:

$$\text{Ac. Ascórbico (mg /100g)} = \frac{C_f \times F.D.}{10}$$

Donde: C<sub>F</sub> = es el valor de X de la ecuación para cada repetición.

F.D = Factor de dilución

### 3.4.3. Cuantificación de polifenoles

La cuantificación de polifenoles totales se realizó según el método Folin-Ciocalteu reportado por SANDOVAL *et al.*, (2001), Para ello se prepararon las siguientes soluciones stocks; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20% en 100 mL y 1 mM (+) - Catequin en metanol / 10 mL. A cada tubo de ensayo se agregó 1580 µL

de agua destilada desionizada (ddH<sub>2</sub>O) y 20 µL de muestra, control y estándares. Se vorteo ligeramente. Para los controles se agregó 20 µL ddH<sub>2</sub>O; los estándares se prepararon a partir de la solución stock 1 mM (+) – Catequin. Muestras, controles y estándares fueron corridos por triplicado para conseguir precisión en los resultados. se agregó 100 µL de la solución de fenol Folin-Ciocalteu, se mezcló e incubó por un minuto a temperatura ambiente. Para neutralizar la reacción se adicionó 300 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20%, se incubó por 2 horas a temperatura ambiente (tiempo en el que hay una completa reacción) y para determinar la cantidad de compuestos fenólicos producidos durante la reacción, se agregó 1 mL de muestra, control o estándar en una cubeta de poliestireno (1 cm x 1 cm x 4,5 cm) y luego se procedió a la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro a 700 nm, los resultados fueron expresados en contenido de mg de Catequina / mL de muestra.

### **3.4.4. Evaluación de la actividad antioxidante**

#### **3.4.4.1. Capacidad de inhibir el radical DPPH**

La capacidad de inhibición del radical DPPH, se realizó por el Método de Brand Williams reportado por SANDOVAL *et al.*, (2001), se preparó 10 mL de solución stock 1mM DPPH en etanol al 96 %. Luego de preparó la solución de DPPH, se agitó por 3 minutos hasta una completa solubilización del compuesto y almacenó a 4°C protegiendo de la luz. A partir de la solución stock se preparó 20 mL de DPPH en etanol al 96% a 100 µM; en una cubeta de poliestireno se agregó 25 µL de muestra a 975 µL de solución de 100 µM de DPPH. La inhibición de radicales libres DPPH se

determinó por la decoloración de la solución de violeta a amarillo, la cual es medida espectrofotométricamente a 515 nm. Para el cálculo se utilizó la expresión:

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = [(Ac - Am)/Ac] \times 100$$

Donde:

Ac: Absorbancia de los controles.

Am: Absorbancia de la muestra en función del tiempo 5 minutos.

#### **3.4.4.2. Coeficiente de inhibición del radical peroxilo**

La capacidad de inhibición del radical peroxilo, se realizó por el Método de SANDOVAL *et al.*, (2001), Se prepararon las siguientes soluciones stock en H<sub>2</sub>O y pH adecuado; 100 mL 2,25 mM de ABTS y 100 mL 20 mM de ABAP y 1 litro de PBS buffer pH 7,4 se preparó la siguiente solución: mezclando 10 mL 2,25 mM ABTS, 10 mL 20 mM ABAP y 80 mL de PBS (pH 7,4); se incubó a 70°C a baño maría por 20 minutos, luego se dejó enfriar sobre el hielo durante 10 minutos. Al mismo tiempo se prepararon las soluciones de las muestras; agregando a 10 µL de cada extracto a 990 µL de la solución de radicales ABTS en una cubeta de poliestireno. La inhibición de los radicales peroxilos se determinó por la decoloración de la solución de radicales ABTS, la cual es medida por espectrofotometría a 414 nm. La capacidad de secuestro del radical peroxilo fue determinado por la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibición peroxilo} = [(Ac - Am)/Ac] \times 100$$

Donde:

Ac: Absorbancia de los controles.

Am: Absorbancia de la muestra en función del tiempo 5 minutos.

### **3.5. Metodología experimental**

#### **3.5.1. Preparación de la muestra**

Las operaciones llevadas a cabo para la preparación de las muestras se indican en la Figura 1 y se describen a continuación:

- **Recepción**

Las yemas terminales recién cosechadas fueron recepcionadas y colocadas en bolsas gruesas de papel.

- **Selección:**

Se realizó con la finalidad de eliminar las yemas que no presentan las características de calidad (yemas maltratadas, pardeadas, rotas, etc.).

- **Blanqueado:**

Esta operación se realizó con la finalidad de inactivar la enzima polifenol oxidasa (para evitar la oxidación de las catequinas). Cada tratamiento fue sometido a un blanqueado a temperatura de ebullición y un tiempo de 60 segundos.

- **Oreado:**

Después del blanqueado, las yemas terminales fueron tendidas sobre mallas de plástico a temperatura ambiente por 2 horas. Esta operación se realizó para reducir el agua proveniente del blanqueado adherida a la yema.

- **Secado**

Las yemas procedentes del oreado ingresaron a la etapa de secado a 65°C en estufa convencional por 14 horas.

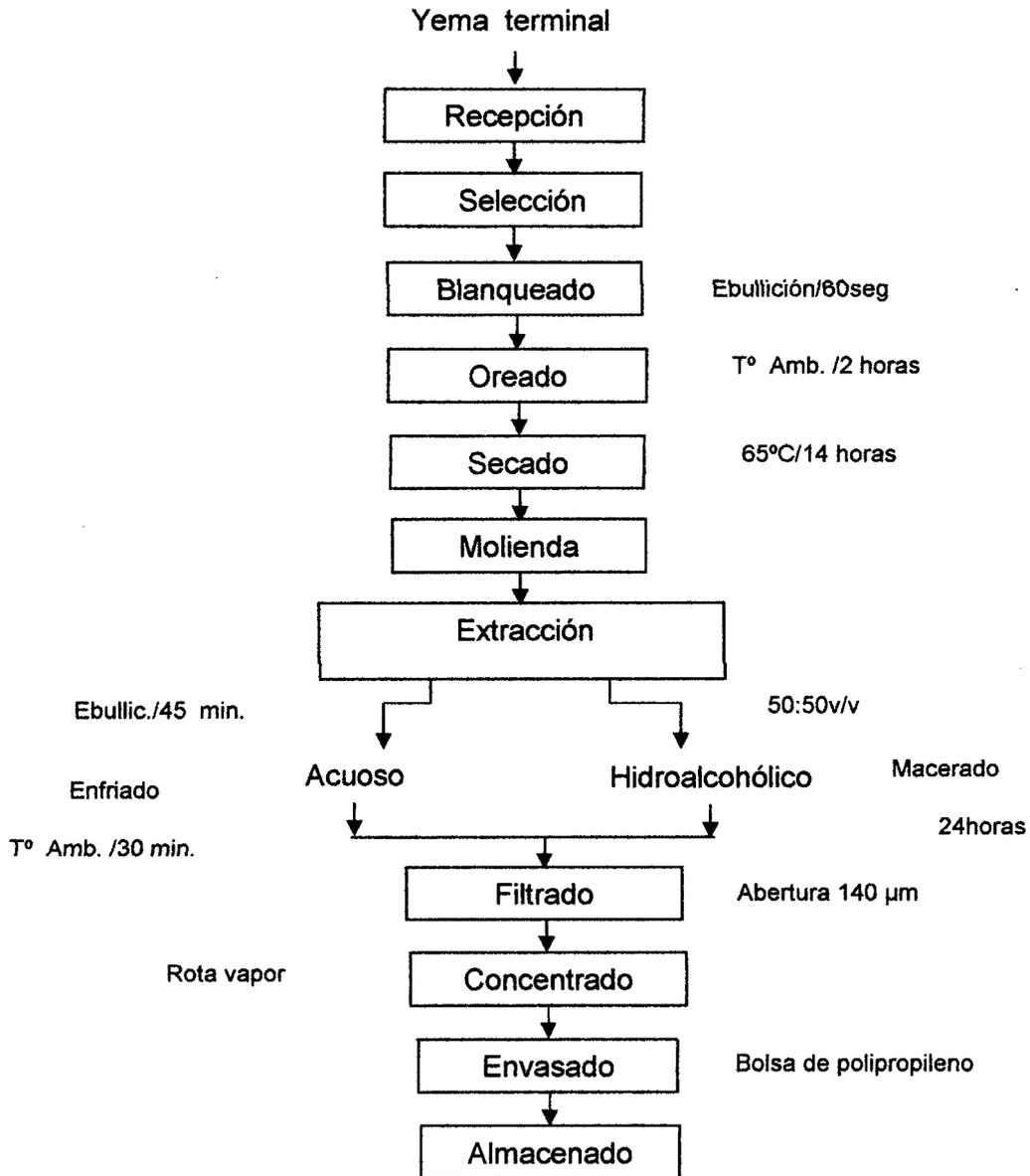


Figura 1. Flujograma de operaciones para la preparación de la muestra de yema terminal de guanábana.

- **Molienda**

Esta operación se realizó utilizando un molino helicoidal

- **Extracción**

Esta operación consistió en extraer dos tipos de extracto y acuoso e hidroalcohólico

- **Extracto acuoso**

Se pesó 10 g de hoja seca y molida, se macera en 300 mL de agua destilada por un tiempo de 10 minutos, se tapó y se sometió a ebullición por 45 minutos, con constante agitación; posteriormente se enfrió a temperatura ambiente por un periodo aproximado de 30 minutos.

- **Extracto hidroalcohólico.**

Se pesó 10 g de hojas de la muestra total molida, ésta se maceró en 300 ml de mezcla etanol-agua (50:50) por un periodo de 24 horas. Las dos primeras horas, la muestra fue agitada en forma manual cada 60 minutos, luego se dejó en reposo hasta completar el tiempo.

- **Filtrado**

El filtrado se realizó mediante un tamiz de abertura de 140  $\mu\text{m}$ .

- **Concentrado**

La concentración se realizó en un rota vapor R-300 a una temperatura de 50°C/70 rpm, presión 22 libras/pul<sup>2</sup>, el volumen se redujo en un 60%.

- **Envasado**

Los extractos: acuoso e hidroalcohólico fueron envasados en bolsas de 250 g de polipropileno de baja densidad.

- **Almacenamiento**

Las muestras preparadas fueron almacenadas en congelación hasta su posterior análisis.

### **3.5.2. Caracterización de fisicoquímica**

Se realizó el análisis fisicoquímico de la yema terminal de guanábana según los métodos descritos en métodos de análisis.

### **3.5.3. Cuantificación de vitamina C**

#### **3.5.3.1. Condiciones de trabajo.**

Se utilizó como fase móvil una solución 0,2 M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ajustado a pH de 2,4 con  $\text{H}_3\text{PO}_4$  y a un flujo de 0,5 mL/min. La cuantificación fue a una longitud de onda de 254 nm.

#### **3.5.3.2. Preparación de la curva estándar**

A partir de la solución estándar de ácido ascórbico de concentración 2,5 mg/mL, se preparó soluciones estándar diluidas de 1, 3, 10, 20, 30, 40 y 50  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Luego se inyectó 20  $\mu\text{L}$  de cada solución y se realizó las lecturas durante 15 minutos a una longitud de onda de 254 nm. Se utilizó el software Class-VP del sistema del HPLC para obtener la ecuación generada por el estándar de AA y a la vez ésta sirvió para estimar la

cantidad de ácido ascórbico (mg/100g) presente en el extracto de la yema terminal de guanábana.

### **3.5.3.3. Cuantificación de la vitamina C**

En un microtubo de 2 mL se tomó 1 mL de cada extracto y 1 mL de agua destilada, se centrifugó a 10000 rpm / 5 min a una temperatura de 4°C. Se separó el sobrenadante y se filtró en filtro de membrana (0,2 µm) antes de ser inyectados al HPLC. Seguidamente se inyectó 20 µL de cada extracto y la lectura se realizó a 254 nm. Los resultados fueron analizados mediante el diseño completamente al azar (DCA) con un arreglo factorial de 3\*2 en los tratamientos donde existió diferencia estadística se realizó la prueba de Tukey  $P < 0,05$ .

### **3.5.4. Cuantificación de polifenoles**

#### **3.5.4.1. Preparación de la curva estándar**

Para determinar la curva estándar de polifenoles totales se utilizó 6 tubos de ensayo por triplicado. A partir de la solución stock de 0,1mM (+)-Catequina, se prepararon soluciones diluidas de 10, 30, 100, 300, 1000 y 3000 µg/ml. En cada tubo de ensayo se adicionó 1580 µL de agua destilada, 20 µL de las soluciones estándar diluida, 100 µL de solución de fenol filin- ciocalteu y finalmente 300 µL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20%. Se incubó 2 horas a temperatura ambiente y luego se realizó la lectura en espectrofotómetro UV/VIS, se leyó a una longitud de onda de 700 nm.

De los resultados obtenidos se graficó concentración Vs absorbancia se procedió a determinar la ecuación y el coeficiente de correlación.

#### **3.5.4.2. Cuantificación de polifenoles**

Para la cuantificación de polifenoles se utilizó 100  $\mu\text{L}$  de cada extracto (acuoso e hidroalcohólico) y 900  $\mu\text{L}$  de agua desionizada. En un tubo de ensayo se adicionó 1580  $\mu\text{L}$  de agua destilada, 20  $\mu\text{L}$  de extracto diluido, 100  $\mu\text{L}$  de solución de fenol filin- ciocalteu y finalmente 300  $\mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20% y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Seguidamente en el espectrofometría UV /VIS a una longitud de onda 700 nm y se leyó la absorbancia. En base a la curva patrón se determinó la concentración de polifenoles expresado en mg de Catequina/mL de solución. Los resultados fueron analizados mediante el diseño completamente al azar (DCA) con un arreglo factorial de  $3 \times 2$  en los tratamientos donde existió diferencia estadística se procedió a determinar la prueba de Tukey  $P < 0,05$ .

#### **3.5.5. Evaluación de la actividad antioxidante**

La evaluación de la capacidad antioxidante se realizó mediante las siguientes pruebas.

##### **3.5.5.1. Coeficiente de inhibición del radical DPPH.**

Se siguió el método descrito en métodos de análisis. Luego se preparó una solución stock de yema terminal de guanábana (40 mg/mL). De esta solución, se prepararon soluciones de trabajo (soluciones intermedias) 30, 100, 200 y 300  $\mu\text{g/mL}$ . A la cubeta de poliestireno se adicionó 25  $\mu\text{L}$  solución intermedia y 975  $\mu\text{L}$  de la solución de 100  $\mu\text{M}$  DPPH y se realizó la lectura en espectrofotómetro a longitud de onda 515 nm, con un tiempo de 5 minutos e

intervalos de tiempo de 30 segundos. Los resultados de la capacidad de inhibir  $IC_{50}$  del radical DPPH fueron analizados mediante el diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial de  $3 \times 2$  y en los niveles donde existió significación estadística se aplicó la prueba de Tukey  $P < 0,05$ .

#### **3.5.5.2. Coeficiente de inhibición del radical peroxilo**

Se preparó una solución stock de extracto de yema terminal de guanábana (40 mg/mL). De este stock, se prepararon soluciones de trabajo (soluciones intermedias) 1, 3, 10, 60  $\mu\text{g/mL}$ . A la cubeta de poliestireno se adicionó 10  $\mu\text{L}$  solución intermedia y 975  $\mu\text{L}$  de la solución de radicales ABTS y la lectura se realizó en espectrofotómetro a longitud de onda de 414 nm, con un tiempo de 5 minutos e intervalos de tiempo de 30 segundos. Los resultados de inhibición del radical de peroxilo se determinaron en cada uno de los extractos mediante el  $IC_{50}$ . Este coeficiente indica la cantidad de extracto vegetal (acuoso y/o hidroalcohólico) en  $\mu\text{g/mL}$ , requerido para inhibir el 50 % del radical peroxilo y fueron analizados mediante el diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial de  $3 \times 2$ . Para niveles donde existió significación estadística se aplicó la prueba de Tukey  $P < 0,05$ .

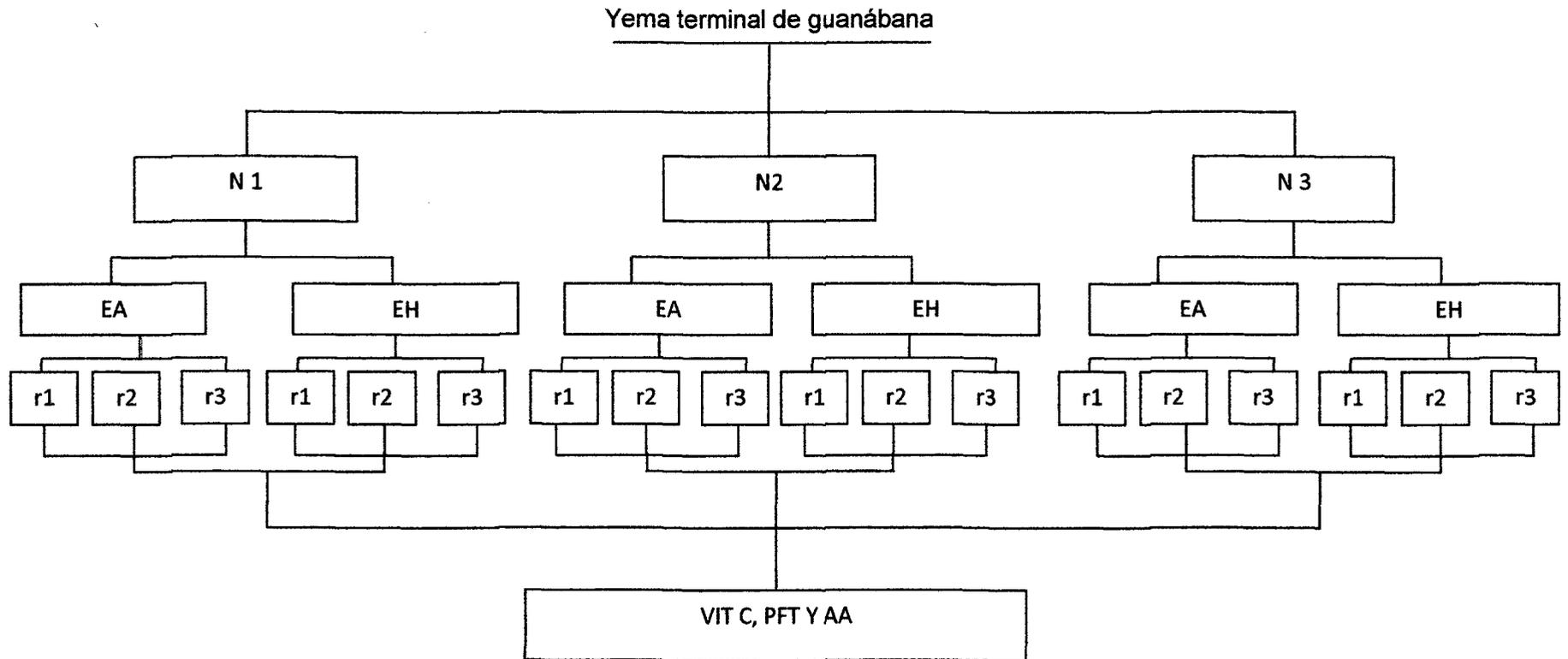


Figura 2. Diseño experimental para evaluación Vitamina C, polifenoles totales y actividad antioxidante

NI, N2 y N3 = Unidades fisiográficas

EA = Extracto acuoso

EH = Extracto Hidroalcohólico

REPETICIONES= r1, r2 y r3

VIT C = Vitamina C

PFT =Polifenoles totales

AA = Actividad antioxidante (Radical DPPH y peroxilo)

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Características fisicoquímicas de la yema terminal de guanábana

Los resultados de la caracterización de la yema terminal de guanábana en base seca y húmeda se presentan en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Análisis fisicoquímico de la yema terminal de guanábana.

Componentes	Unidad	Base húmeda	Base seca
Humedad	%	76,025± 0,819	-----
Proteína(N*6,25)	%	3,985	16,623±0,003
Grasa	%	1,724	7,190±0,064
Ceniza	%	1,490	6,214±0,119
Fibra	%	4,941	20,607±0,167
Carbohidratos	%	11,835	49,336
Azúcares reductores	%	-----	5,393±0,124
Azúcares totales	%	-----	9,081±0,253
Sólidos solubles (°Brix)	Extracto	-----	1,867±0,115
Acidez iónica(pH)	Extracto	-----	5,283±0,029

## 4.2. Cuantificación de vitamina C

### 4.2.1. Determinación de curva estándar de vitamina C

En el Cuadro 5 y en la Figura 3 se presenta la absorbancia de las diferentes concentraciones de ácido ascórbico expresado en  $\mu\text{g/mL}$ .

Cuadro 5. Determinación de la curva estándar de vitamina C.

Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbancia (mUA)	Área	Tiempo Retención(minutos)
1	9,305	108003	9,950
3	20,623	252028	9,943
10	71,855	865849	9,942
20	136,737	1674532	9,945
30	203,041	2534599	9,952
40	280,776	3526112	9,955
50	349,747	4408542	9,958

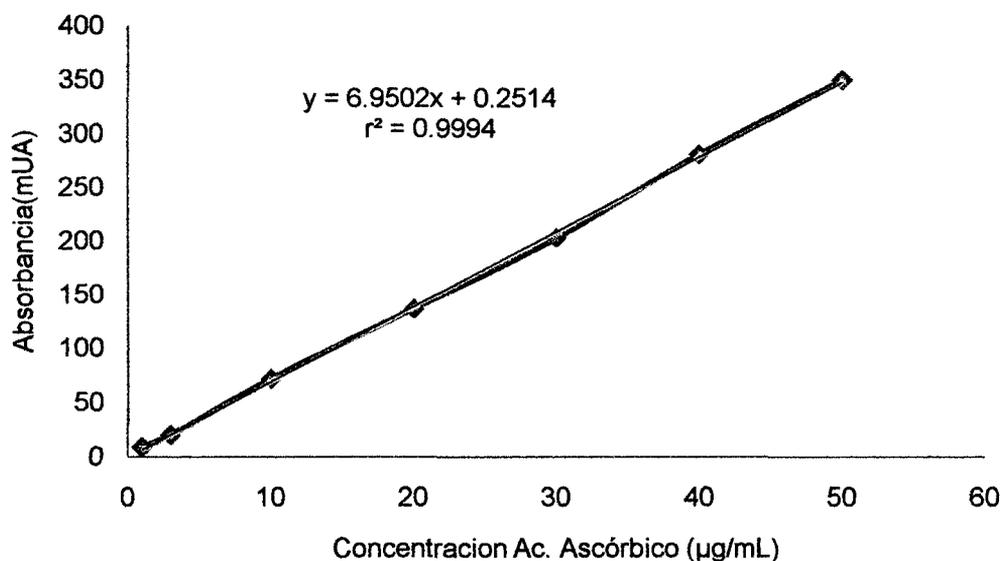


Figura 3. Curva estándar de vitamina C.

#### 4.2.2. Contenido de vitamina C en la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica

El contenido de vitamina C en la yema terminal de guanábana se presenta en el Cuadro 6 y en la Figura 4 que corresponde a cada unidad fisiográfica y tipo de extracto.

Cuadro 6. Contenido de vitamina C en la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica y método de extracción.

		Vitamina C(mg AA /100mL de muestra)	
Unidad fisiográfica	Niveles m.n.s.m	Método de extracción	
		Acuoso	Hidroalcohólica
Ta	650	0,718±0,05 <sup>b</sup>	0,695±0,04 <sup>b</sup>
Cb	800	0,869±0,02 <sup>a</sup>	0,890±0,03 <sup>a</sup>
Ma	1600	0,247±0,02 <sup>c</sup>	0,177±0,03 <sup>c</sup>

Mg AA\* = mg de ácido ascórbico

Los valores representan (promedio ± SEM) los datos provienen del experimento (n=3) valores de una misma columna con superíndices diferentes son significativos. (p<0.05)

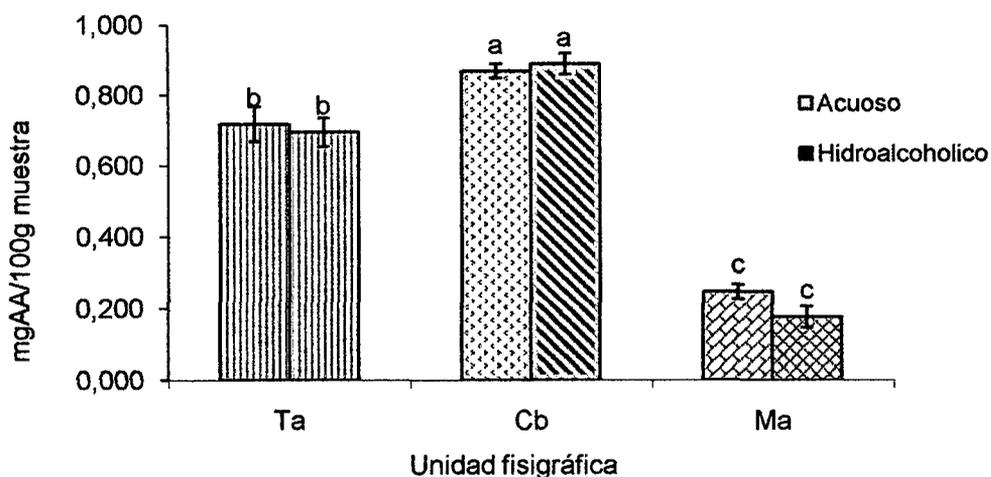


Figura 4. Contenido de vitamina C de la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica y método de extracción.

#### 4.2.3. Contenido de vitamina C por tipo de extracto

Para la cuantificación de vitamina C se plantearon 6 tratamientos éstas incluyen la interacción fisiográfica con el método de extracción.

Cuadro 7. Contenido de vitamina C en la yema terminal de guanábana.

Tratamiento	Especificación	Vitamina C (mg AA/100mL
		muestra)
T1	Ta-extracto acuoso	0,718±0,05 <sup>b</sup>
T2	Ta-extracto hidroalcohólico	0,695±0,04 <sup>b</sup>
T3	Cb-extracto acuoso	0,869±0,02 <sup>a</sup>
T4	Cb-extracto hidroalcohólico	0,890±0,03 <sup>a</sup>
T5	Ma- extracto acuoso	0,247±0,02 <sup>c</sup>
T6	Ma- extracto hidroalcohólico	0,177±0,03 <sup>c</sup>

Los valores representan (promedio ± SEM) los datos provienen del experimento (n=3) valores de una misma columna con superíndices diferentes son significativos. (p<0,05).

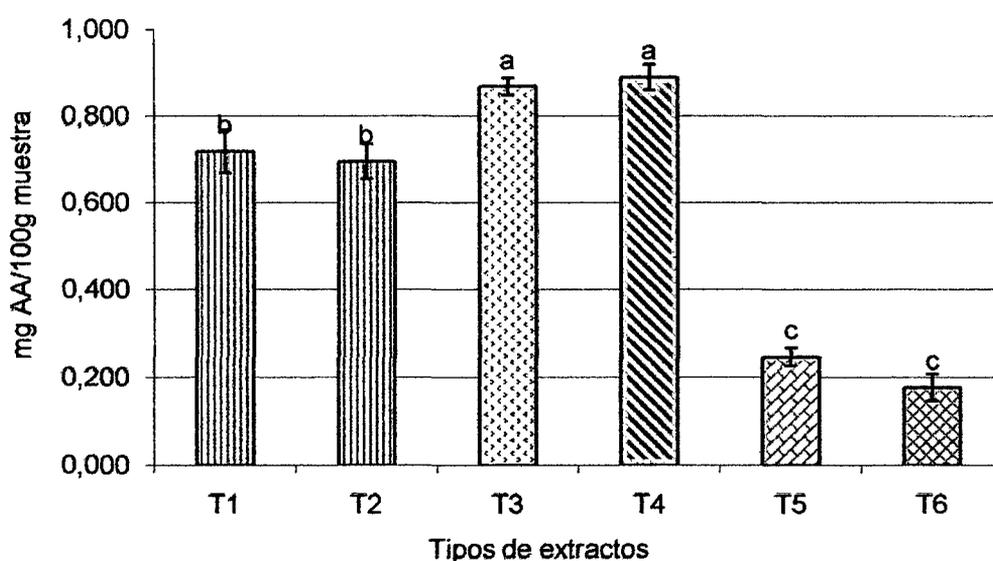


Figura 5. Contenido de vitamina C de la yema terminal de guanábana.

### 4.3. Cuantificación de polifenoles totales

#### 4.3.1. Curva estándar de polifenoles

En el Cuadro 8 y en la Figura 6 se presenta la absorbancia de las diferentes concentraciones de catequina expresado en  $\mu\text{M}$ .

Cuadro 8. Determinación de curva estándar de polifenoles totales

Catequina ( $\mu\text{M}$ )	Absorbancia
10	0,0063
30	0,0143
100	0,0403
300	0,1583
1000	0,4427
3000	1,3547

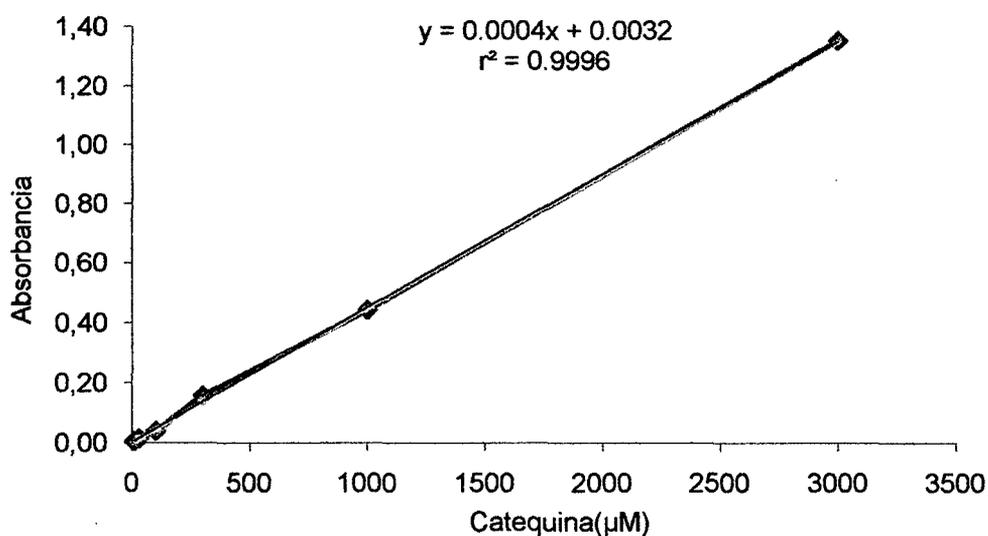


Figura 6. Curva estándar de catequina para la cuantificación de polifenoles totales.

#### 4.3.2. Contenido de polifenoles totales por unidad fisiográfica y método de extracción

El contenido de polifenoles totales de la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica y método de extracción se presenta en el Cuadro 9 y Figura 7.

Cuadro 9. Contenido de polifenoles totales en la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica y método de extracción.

Unidad fisiográfica	Niveles m.n.s.m.	Polifenoles Totales (mg catequina/mL muestra)	
		Método de Extracción	
		Acuoso	Hidroalcohólico
Ta	650	56,53±2,43 <sup>a</sup>	67,92±1,39 <sup>b</sup>
Cb	800	61,66±1,49 <sup>a</sup>	80,33±1,14 <sup>a</sup>
Ma	1600	45,35±0,59 <sup>b</sup>	40,32±0,72 <sup>c</sup>

Los valores representan (promedio ± SEM) los datos provienen del experimento (n=3) valores de una misma columna con superíndices diferentes son significativos. (p<0,05).

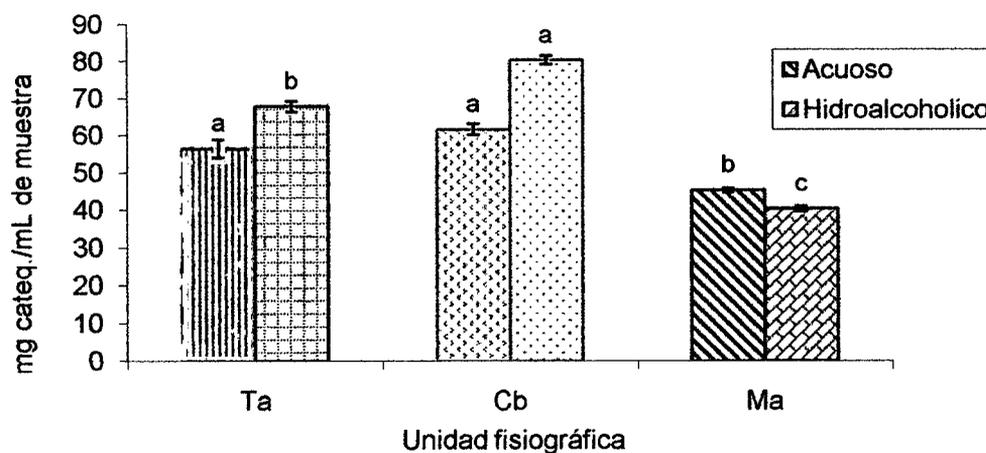


Figura 7. Contenido de polifenoles de la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica y extracto.

### 4.3.3. Contenido de polifenoles totales por tratamiento

En el Cuadro 10 y en la Figura 8 se presenta los resultados de la cuantificación de polifenoles totales de la yema terminal de guanábana de la interacción de cada unidad fisiográfica y por método de extracción.

Cuadro 10. Contenido de polifenoles totales en la yema terminal de guanábana.

Tratamiento	Especificación	Polifenoles Totales (mg catequina /mL muestra)
T1	Ta -extracto acuoso	56,53 ± 2,43 <sup>c</sup>
T2	Ta -Extracto hidroalcohólico	67,92±1,39 <sup>b</sup>
T3	Cb-extracto acuoso	61,66±1,49 <sup>c</sup>
T4	Cb -Extracto hidroalcohólico	80,33±1,14 <sup>a</sup>
T5	Ma -extracto acuoso	45,35±0,59 <sup>d</sup>
T6	Ma -Extracto hidroalcohólico	40,32±0,72 <sup>d</sup>

Los valores representan (promedio ± SEM) los datos provienen del experimento (n=9) valores de una misma columna con superíndices diferentes son significativos. (p<0,05).

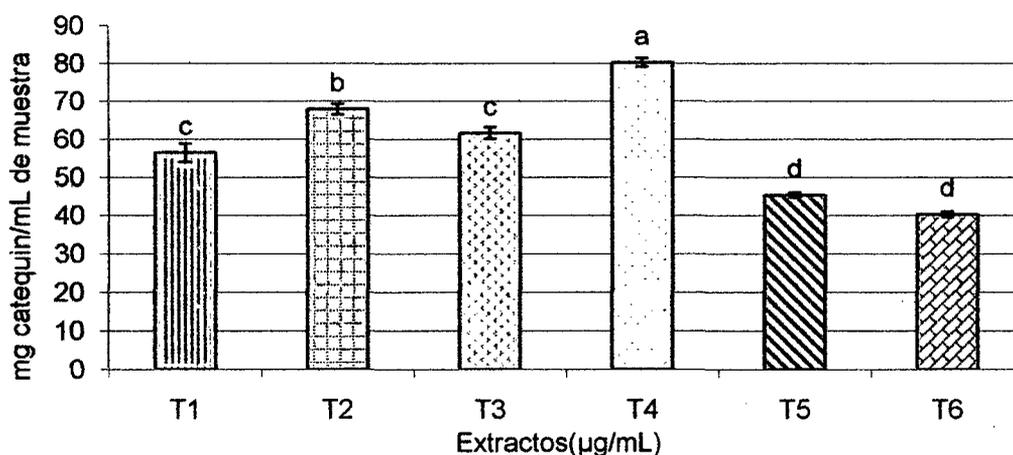


Figura 8. Contenido de polifenoles de la yema terminal de guanábana.

#### 4.4. Actividad antioxidante de la yema terminal de guanábana

##### 4.4.1. Coeficiente de inhibición del radical DPPH

##### 4.4.1.1 Coeficiente de inhibición del radical DPPH por unidad fisiográfica y método de extracción

Los resultados se presentan en el Cuadro 11 y Figura 9.

Cuadro 11. Inhibición de radical DPPH ( $IC_{50}$ ) de la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica y métodos de extracción.

Niveles		DPPH $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	
Unidad fisiográfica	m.n.s.m.	Método de Extracción	
		Acuoso	Hidroalcohólico
Ta	650	$86,712 \pm 0,58^c$	$91,394 \pm 0,56^b$
Cb	800	$132,874 \pm 0,59^b$	$84,610 \pm 0,64^c$
Ma	1600	$150,146 \pm 0,83^a$	$164,752 \pm 0,93^a$

Los valores representan (promedio  $\pm$  SEM) los datos provienen del experimento ( $n=9$ ) valores de una misma columna con superíndices diferentes son significativos. ( $p<0,05$ )

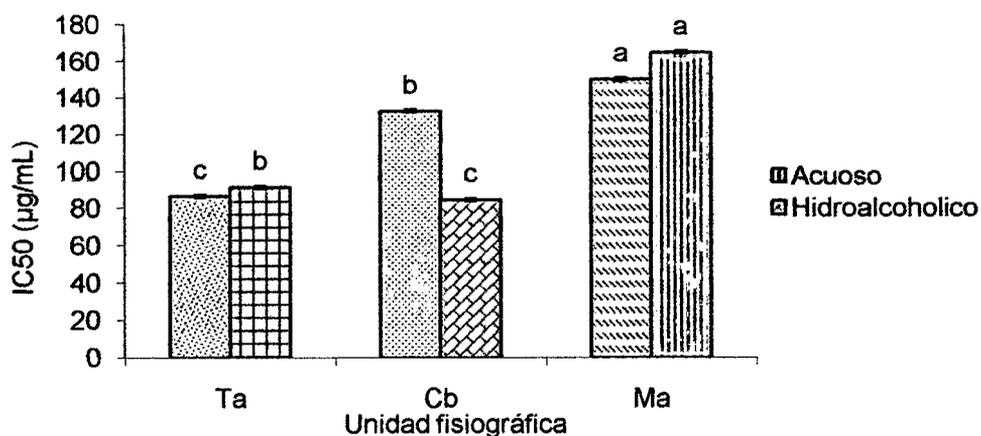


Figura 9. Capacidad antioxidante de los extractos de la yema terminal de guanábana utilizando el test DPPH.

#### 4.4.1.2 Coeficiente de inhibición del radical DPPH por tratamiento

El coeficiente de inhibición del radical DPPH en la yema terminal de guanábana se presenta en el Cuadro 12 y en la Figura 10.

Cuadro 12. Capacidad de inhibir radicales libres de DPPH ( $IC_{50}$ ) de la yema terminal de guanábana.

Tratamiento	Especificación	DPPH $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
T1	Ta-extracto acuoso	$86,712 \pm 0,58^e$
T2	Ta-extracto hidroalcohólico	$91,395 \pm 0,56^d$
T3	Cb-extracto acuoso	$132,875 \pm 0,59^c$
T4	Cb-Extracto hidroalcohólico	$84,610 \pm 0,64^e$
T5	Ma-extracto acuoso	$150,046 \pm 0,83^b$
T6	Ma-Extracto hidroalcohólico	$164,752 \pm 0,93^a$

Los valores representan (promedio  $\pm$  SEM) los datos provienen del experimento ( $n=9$ ) valores de una misma columna con superíndices diferentes son significativos. ( $p<0,05$ ).

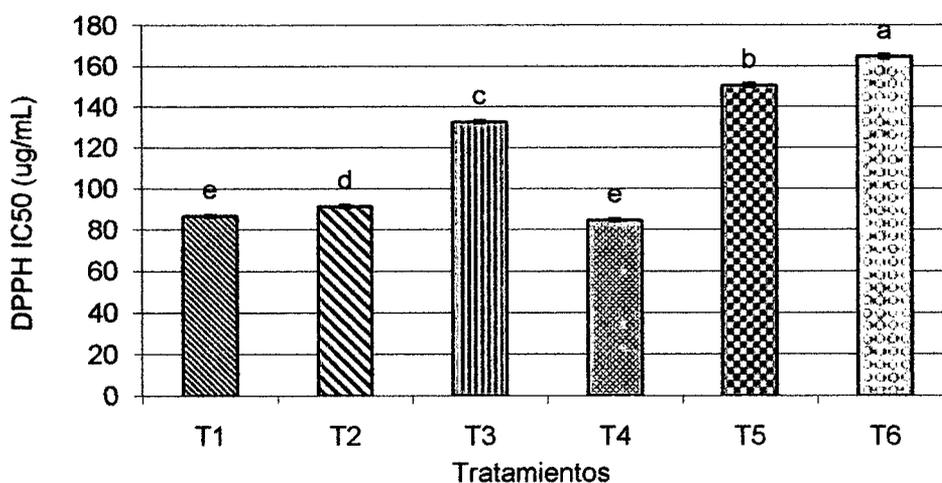


Figura 10. Comportamiento del  $IC_{50}$  del radical DPPH de la yema terminal de guanábana

#### 4.4.2 Coeficiente de inhibición del radical peroxilo

##### 4.4.2.1 Coeficiente de inhibición del radical peroxilo por unidad fisiográfica y método de extracción

Los resultados del coeficiente de inhibición del radical peroxilo, considerando las unidades fisiográficas y por cada tipo de extracto, se presentan en el Cuadro 13 y figura 11.

Cuadro 13. Coeficiente de inhibición del radical peroxilo en la yema terminal de guanábana por unidad fisiológica y método de extracción

Unidad fisiográfica	Niveles			Peroxilo (IC50 µg/mL)	
	m.n.s.m.	Métodos de Extracción		Acuoso	Hidroalcohólico
Ta	650	12,722 ± 0,18 <sup>c</sup>	11,375 ± 0,02 <sup>c</sup>		
Cb	800	19,658 ± 0,05 <sup>b</sup>	14,297 ± 0,14 <sup>b</sup>		
Ma	1600	21,035 ± 0,10 <sup>a</sup>	17,118 ± 0,05 <sup>a</sup>		

Los valores representan (promedio ± SEM) los datos provienen del experimento (n=9) valores de una misma columna con superíndices diferentes son significativos. (p<0,05).

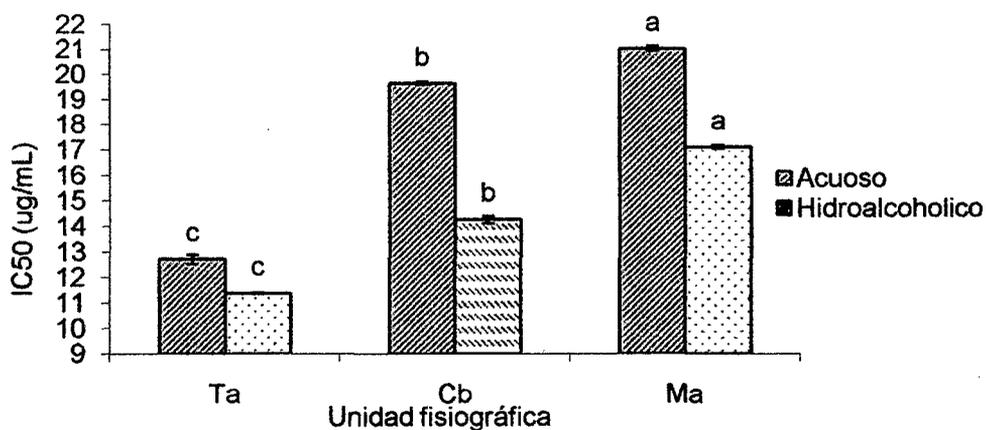


Figura 11. Coeficiente de inhibición del radical peroxilo de la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica y método de extracción.

#### 4.4.2.2 Coeficiente de inhibición del radical peroxilo por tratamiento

Los resultados del coeficiente de inhibición del radical peroxilo de la yema terminal de guanábana en los 6 tratamientos se presentan en el Cuadro14 y en la figura12.

Cuadro 14. Coeficiente de inhibición del radical peroxilo de la yema terminal de guanábana.

Tratamiento	Especificación	Peroxilo (IC <sub>50</sub> µg/mL)
T1	Ta-extracto acuoso	12,722 ± 0,18 <sup>e</sup>
T2	Ta-extracto hidroalcohólico	11,375 ± 0,02 <sup>f</sup>
T3	Cb -extracto acuoso	19,658 ± 0,53 <sup>b</sup>
T4	Cb-extracto hidroalcohólico	14,296 ± 0,14 <sup>d</sup>
T5	Ma-extracto acuoso	21,036 ± 0,10 <sup>a</sup>
T6	Ma-extracto hidroalcohólico	17,108 ± 0,05 <sup>c</sup>

Los valores representan (promedio ± SEM) los datos provienen del experimento (n=9) valores de una misma columna con superíndices diferentes son significativos. (p<0,05).

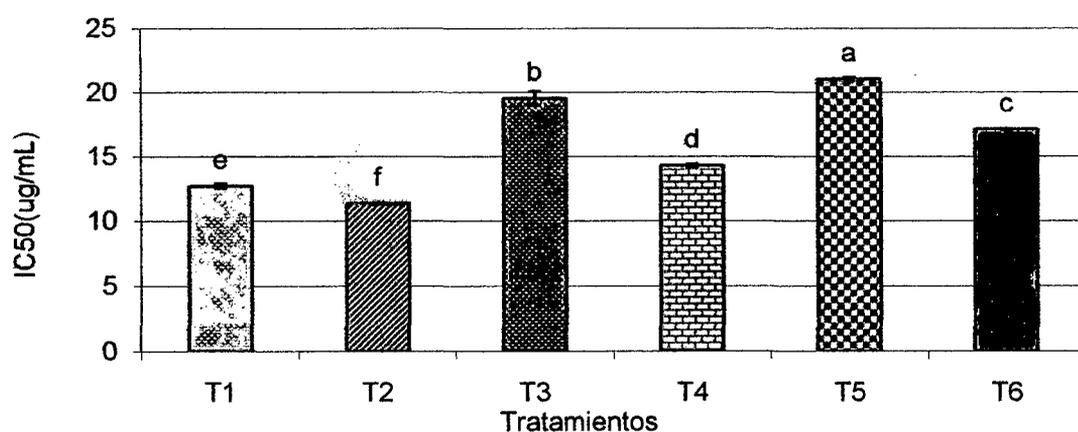


Figura 12: Coeficiente de inhibición del radical peroxilo de la yema terminal de guanábana.

## V. DISCUSIÓN

### 5.1. Caracterización fisicoquímica de la yema terminal de guanábana

#### 5.1.1. Humedad

El contenido de humedad obtenido fue de 76,025%; ORDOÑEZ (1987), reporta 70,25% de humedad en hoja de yuca (*Maihot esculenta*), ESPINOZA (1988), reporta 73,20% en hoja de kutzú (*Pueraria phoseloides*), VEGA (2001), reporta 75,40% en hoja de eritrina (*Erythrina Edullis*) y FENNEMA (1993), menciona que el agua en la cantidad, localización y orientación, es crucial para los procesos vitales e influye profundamente en la estructura, aspecto y sabor de los alimentos; así mismo, permite que un alimento sea más susceptible a la alteración.

#### 5.1.2. Proteína

Con respecto al contenido de proteína en la yema terminal de guanábana se cuantificó 3,985% en base húmeda y 16,623±0,003% en base seca, comparando este valor con la hoja de erythrina (*erythrina Edullis*) 6,27% según VEGA (2001); en la hoja de kutzú (*pueraria phoseoloides*) 7,23% según ESPINOZA (1993). Como se puede observar, la yema terminal de guanábana se encuentra dentro del rango, las variaciones están sujetas a lo mencionado por VEGA (2001), la posición y edad de las hojas dentro de las ramas influyen directamente en el contenido de nutrientes; la digestibilidad y el contenido de

proteínas disminuye cuando la hoja es madura y cuando es tierna, lo que nos indica que cuando la hoja es madura se produce una traslocación del nitrógeno a las hojas tiernas y un aumento de la lignina, y en caso de las hojas tiernas se debe a que la hoja no completa su máximo desarrollo.

### 5.1.3. Grasa

El contenido de grasa en la yema terminal de guanábana fue 1,724% en base húmeda y  $7,190 \pm 0,064\%$  en base seca; comparando este resultado con la hoja de *erythrina* (*erythrina Edullis*) 1,79% en base húmeda, según VEGA (2001), en hoja de *kutzú* 0,54% en base húmeda; según ESPINOZA (1993), se puede ver que el valor citado está en el rango de grasa de otras hojas. Según AQUINO *et. al.*, (1989), el contenido de grasa bruta es atribuido a los lípidos derivados entre ellos, esteroides y triterpenos que poseen las plantas

### 5.1.4. Ceniza

En la yema terminal de guanábana se cuantificó 1,49% en base húmeda y  $6,124 \pm 0,119\%$  en base seca; VEGA (2001), reporta en hoja de *erythrina* 0,45% en base húmeda, ESPINOZA (1993), en hoja de *kutzu* (*Pueraria phaseoloides*) reporta 2,19% en base húmeda y CHIRINO *et al.* (2006), reportan en hoja guayaba (*Psidium guajava L.*)  $6,19 \pm 0,20\%$ . La variación del contenido de ceniza puede atribuirse a lo citado por FENNEMA (1993), quien señala que a medida que se incrementa la edad de la planta existe una concentración más elevada de ceniza; así mismo, una combustión demasiado activa puede ocasionar pérdidas de ceniza o condición a que se fundan y forman inclusiones de carbono que no se incineran. Este contenido de

ceniza no tiene necesariamente la misma composición que la materia orgánica del alimento original, debido a que existen pérdidas por volatilización (REÁTEGUI, 2003).

#### **5.1.5. Fibra**

El resultado del contenido de fibra en la yema terminal de guanábana fue de 4,941% en base húmeda y  $20,607 \pm 0,167\%$  en base seca. VEGA (2001), reporta en hoja de erythrina (*erythrina Edullis*) 9,17%; ESPINOZA (1993), en hoja de kudzu 9,10%; se puede decir que la yema terminal de guanábana tiene menor cantidad de fibra. Según BADUI (1984), la fibra está constituida por los componentes estructurales de las paredes celulares de los vegetales, entre los que destacan la celulosa, hemicelulosa y pectina. Además, la composición de dicha fibra varía considerablemente de una especie vegetal a otra, dependiendo del grado de madurez en el momento de su recolección.

#### **5.1.6. Carbohidratos**

El contenido carbohidratos fue de 11,835% en base húmeda y 49,366% base seca, comparado con VEGA (2001), éste cita 6,86% en hoja de erythrina (*erythrina Edullis*), ESPINOZA, (1993) reporta 7,74% para hoja de kudzu; comparando estos resultados se puede afirmar que el contenido de carbohidrato en la yema terminal de guanábana es mayor. Esto puede atribuirse a lo reportado por FENNEMA (1993), quien indica que los carbohidratos constituyen los tres partes del peso seco de todas las plantas; así mismo, la glucosa es el monosacárido más abundante que se encuentra en

las frutas y hortalizas y en concentración depende del grado de madurez del producto (BADUI, 1984).

- El contenido de Azúcares reductores en yema terminal de guanábana fue de  $5,393 \pm 0,124\%$ ; según GIRALDO (2000), los azúcares reductores son una reacción característica de las aldosas y cetosas debido a la oxidación del grupo carbonilo.
- Los azúcares totales en la yema terminal de guanábana fue de  $9,081 \pm 0,253\%$  de azucars totales, al respecto se puede indicar que el contenido de azúcar total aumenta en forma continua cuando un fruto madura, esto es debido a que los almidones se van hidrolizando en forma de azúcar.
- Los sólidos solubles en el extracto de la yema terminal de guanábana fue de  $1,867 \pm 0,115\%$ , según PRIMO (1997), el contenido de sólidos solubles es un índice comercial y ésta es una medida de la densidad a  $20^{\circ}\text{C}$  de una solución de sacarosa al 1%, a ésta concentración corresponde también un determinado índice de refracción.
- Acidez iónica (pH). El pH en el extracto de yema terminal de guanábana fue  $5,28 \pm 0,029$ , en hoja de erythrina el pH fue 5,9 según VEGA (2001), en hoja de yuca el pH fue 6,0 según ORDOÑEZ (1987). LEHNINGER (1979) menciona que el pH es una medida para designar la concentración real de iones  $\text{H}^+$  (y por tanto de iones  $\text{OH}^-$ ) en cualquier disolución acuosa, es el intervalo de acidez entre las concentraciones de 1,0 M de  $\text{H}^+$  y 1,0 M de  $\text{OH}^-$ . KIRK *et al.*, (1996) indican que la medición del pH es importante para conocer la eficacia de las conservas y vigilar el alimento.

## 5.2. Contenido de vitamina C

### 5.2.1. Curva estándar de vitamina C

Para la determinación de la concentración de vitamina C en el extracto acuoso e hidroalcohólico de la yema terminal de guanábana se elaboró una curva patrón utilizando como estándar ácido ascórbico de 1 a 50  $\mu\text{g/ml}$  y los resultados de absorbancia fueron leídos a 254 nm; en el Cuadro 5 se presenta el área de la curva estándar para cada concentración y el tiempo de retención en minutos. En la Figura 3 se presenta el diagrama de dispersión de las absorbancia y como se puede ver esta es una línea recta matemática de primer orden, a esta línea se llama línea de correlación; en este caso está relacionado a un modelo matemático de primer orden porque sólo hay dos variables (RITCHEY, 2002).

En la misma figura se observa que existe una correlación positiva ya que a un incremento en el nivel de las concentraciones(x) se relaciona con un incremento en el nivel de absorbancia (y), así mismo se encontró un valor de  $R^2 = 0,9994$  esto indica que existe una correlación positiva muy fuerte o casi perfecta (HERNÁNDEZ *et al.*, 2001).

Así mismo para la cuantificación de vitamina C se utilizó en el patrón al ácido ascórbico  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ , PM 176,13 su estructura correspondiente a la lectura de ácido L-XILO-2- cetohehónico (BADUI, 1977).

### **5.2.2. Contenido de vitamina C en la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica y método de extracción.**

La cuantificación de vitamina C en las hojas terminales de guanábana fueron analizados mediante el diseño completamente al azar (DCA) con un arreglo factorial de 3 x 2 (A-II), se encontró diferencia altamente significativa entre la unidad fisiográfica y método de extracción.

En el Cuadro 6 y Figura 4 se presenta los resultados del contenido de vitamina C por unidad fisiográfica y método de extracción; con respecto al extracto acuoso se puede apreciarse que existe diferencia estadística significativa (A-IIa) comparando los promedios mediante la prueba de Tukey  $p < 0,05$  se encontró que los tratamientos terraza alta (Ta) y colina baja (Cb) si presentaron diferencias estadística  $0,718 \pm 0,05$  y  $0,869 \pm 0,02$  mg AA/100 mL de muestra respectivamente. Estos dos tratamientos son los mejores comparados a montaña alta (Ma)  $0,247 \pm 0,02$  mg AA/100 mL de muestra, esto pudo deberse según COSTE (1969), a factores como el clima, temperatura, insolación, fertilidad de suelos, etc.

Con respecto al extracto hidroalcohólico también se encontró diferencia estadística (A-IIb), comparando los promedios mediante la prueba de Tukey  $p < 0,05$  se encontró que los tratamientos que se comportaron mejores correspondieron a terraza alta (Ta) y colina (Cb)  $0,695 \pm 0,04$  y  $0,890 \pm 0,03$  mgAA/100 mL de muestra respectivamente. La menor concentración fue  $0,177 \pm 0,03$  mg AA/100mL de muestra que corresponde a montaña alta (Ma). Comparando ambos métodos de extracción se puede afirmar que, el medio hidroalcohólico tiene valores mayores comparado al extracto acuoso, esto

puede atribuirse a lo reportado por MOHD *et al.* (2001) quienes indican que la cantidad de extracción de compuestos antioxidantes varía en función a la polaridad del medio (polar y no polar).

### 5.2.3. Contenido de vitamina C por tratamientos.

En el Cuadro 7 y en la Figura 5 se presenta los resultados del contenido de vitamina C en la yema terminal de guanábana, en los 6 tratamientos que fueron la interacción de la unidad fisiográfica y el método de extracción según el análisis estadístico se encontró que existe diferencia altamente significativa (A-III) entre los tratamientos, comparando los promedios utilizando la prueba de Tukey  $p < 0,05$  se encuentra que el mejor tratamiento correspondió a la unidad fisiográfica de colina baja y extracto hidroalcohólico  $0,890 \pm 0,03$  mg AA/100 mL de muestra, comparando este resultado con REÁTEGUI (2003), quién en agua de coco reportó  $0,46 \pm 0,03$  mg/ 100 mL de muestra, esto indica que la yema terminal de guanábana tiene alto contenido de vitamina C. Como se sabe, la vitamina C es necesario en la síntesis del tejido conectivo colágeno y para la buena formación de huesos (BADUI, 1984); entonces la yema terminal de guanábana se puede considerar como una fuente importante de ésta vitamina. El menor contenido correspondió a los tratamientos de montaña alta (Ma) con extracto acuoso e hidroalcohólico de  $0,247 \pm 0,02$  y  $0,177 \pm 0,03$  mg AA/100 mL de muestra respectivamente, esto permite indicar que el factor que más influye es la unidad fisiográfica que el tipo de extracto.

En conclusión el mayor contenido de vitamina C en la yema terminal de guanábana corresponde a la unidad fisiográfica de colina baja y el extracto hidroalcohólico  $0,890 \pm 0,03$  mg AA/100 mL de muestra.

### 5.3. Contenido de polifenoles totales

#### 5.3.1. Determinación de la curva estándar de polifenoles

Para la curva estándar se utilizó la (+)-catequina, se preparó concentraciones comprendida entre 10 a 3000  $\mu\text{M}$  de (+)-Catequina y se adicionó solución de fenol de Folin- Ciocalteu y carbonato de sodio al 20% ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  20%), se incubó por 2 horas y se cuantifico las Absorbancia a 700nm, los resultados se presentan en el Cuadro 8 y en la Figura 6, en ella se indica al valor de  $r^2$  de la curva 0,9994 este valor es muy aceptable porque tiene una buena estimación de ajuste de los datos, así mismo indica la capacidad predictiva de los datos ajustados a la variable total explicativa del modelo; así mismo, valor cercano a 1 se considera ajustes casi perfectos (HERNÁNDEZ *et al.*, 2001).

El método de Folin – Ciocalteu modificado por SANDOVAL *et al.*, (2001), para la curva estándar utiliza (+)-catequina porque la Catequina es un flavonoide que parecen tener una actividad anticancirigena reconocida, aunque sus propiedades son mucho más amplio. Entre estas podríamos mencionar sus propiedades antiartritis, antiinflamatorio, altiulcericas, antiagregantes, inmunoestimulantes.

Por otro lado ANDREW, (1977) indica que este método permite medir fenoles totales y para la cuantificación debe crearse la curva de

calibración y puede realizarse con ácido gálico (GAE), porque este es un compuesto estable y se pierde sólo el 5% después de 2 semanas en refrigeración.

### **5.3.2. Contenido de polifenoles totales en la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica y método de extracción**

En este estudio la cuantificación de polifenoles totales en las hojas terminales de guanábana fueron analizados mediante el diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial de 3\*2 (A-IV), donde se encontró diferencia altamente significativa entre la unidad fisiográfica y método de extracción.

En el cuadro 9 y en la figura 7 se presentan los valores de polifenoles totales; éstas varían de acuerdo a la ubicación fisiográfica; con respecto la Terraza alta (Ta) y Colina baja (Cb) estos valores se incrementan y en la ubicación fisiográfica de montaña alta (Ma) tiende a disminuir en los métodos de extracción (acuoso e hidroalcohólico).

Realizado el análisis estadístico (A-IVa), mediante la prueba de Tukey  $p < 0,05$  en el extracto acuoso se determinó que entre Terraza alta (56,53 mg cateq/mL de muestra) y colina baja (61,66 mg cateq/ mL de muestra) y en ambos casos no se encontró diferencia estadística, pero con respecto a la unidad fisiográfica de Montaña alta (45,35 mg cateq/ mL de muestra) si se encontró diferencia estadística.

Por otro lado mediante el método de extracción de polifenoles utilizando un extracto hidroalcohólico se observó que existe diferencia estadística altamente significativa (A -IVb) entre las unidades fisiográficas, así

mismo se observó que Cb (80,33mg cateq/ mL de muestra) presenta el mayor valor, seguido de Ta (67,92 mg cateq/mL de muestra) y Ma (40,32mg cateq/mL de muestra). En general la unidad fisiográfica de colina baja presenta la mayor cantidad de polifenoles, esto puede deducirse que se debe a que en esta ubicación geográfica los suelos tienen poca pendiente, no tiene buen drenaje y tiene la tendencia a formar de humus no descompuestos (DAUBENMIRE, 1990).

Esta diferencia posiblemente se debe al factor suelo porque en la unidad fisiográfica (Ma), los suelos tienen menor cantidad de calcio, además esta zona es más lluviosa comparado a las unidades fisiográficas de Ta y Cb; al respecto ROJAS (1985), menciona que en climas lluviosos los suelos necesitan ser encalados.

### **5.3.3. Contenido de polifenoles totales por tratamientos**

En el Cuadro 10 y en la Figura 8 se muestran la cuantificación de polifenoles totales en la yema terminal de guanábana para los 6 tratamientos que fueron la interacción de unidad fisiográfica y método de extracción. Realizado el análisis estadístico (A-V) se determinó que existe diferencia estadística altamente significativa, aplicado la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) se encontró que existe una relación entre la unidad fisiográfica y el método de extracción.

El mayor contenido de polifenoles se obtuvo en T4 (80,33mg cateq/ml de muestra) que comprende a Cb (colina baja) y extracto hidroalcohólico, seguido de T2 (67,92mg cateq/ mL de muestra) en terraza alta

y extracto hidroalcohólico y finalmente T3 (61,66mg cateq/ mL de muestra) que es colina baja y extracto acuoso; este comportamiento se explica porque a pesar de que el agua tiene un polaridad más alta que el etanol, la presencia de compuestos orgánicos más solubles en etanol que en agua y sensibles al reactivo de solución de fenol de Folin - Ciocalteu, provocaron las diferencias en la cantidad de polifenoles extraídos ( MONROY *et al.*, 2004).

Por otro lado mediante la extracción acuosa se observa menor extracción de polifenoles debido que el agua extrae polifenoles que se hallan como glúcidos pero no los taninos condensados, así mismo indica que la fracción acuosa contiene mayor polifenoles (NÚÑEZ, 2002).

Como mejor método de cuantificación de polifenoles totales en la yema terminal de guanábana fue 80,33 mg cateq/ mL de muestra en la unidad fisiográfica de colina baja y el método de extracción hidroalcohólico, comparado a extracción acuosa de hojas de pata de vaca (*Bauhinia Kalbreyeri* Harms) se tiene 18,47 mg EAG/g peso seco (MURILLO, 2007), para el Matico (*Piper s.p*) se cuantificó 2,44mg EAG/ g muestra) (RAMOS, 2005); en el Cedrón (*Aloysia tripillia*) en extracto acuoso tiene 2,44 mg EAG/ peso seco, (ESTRELLA, 2002) y para las hojas de Atadijo de las especies *Persea caerulea*, *Ochroma pyramidale*. y *Vismia baccifera* en extractos hidroalcohólico se determinó 117,317; 157,346 y 87,125 mg catequina/g en hoja seca respectivamente (TELLO, 2008).

Como se puede observar en la expresión de la cantidad de polifenoles se tiene la expresión de Acido gálico (EAG) y catequina, esto se debe a que los polifenoles se integran en dos familias principales, el ácido

fenólico y flavonoides; así mismo, entre los flavonoides se encuentran combinaciones de tipo heterosido que son poco habituales, aunque se puede encontrar esterificados como el ácido gálico. Dentro de los flavonoles más comunes en los alimentos son los de tipo flavan-3-ol, que pueden existir en forma de estructuras monómeros (catequinas) (SANTOS, 2001).

La mayor cantidad de polifenoles totales en el presente estudio correspondió a la unidad fisiográfica de colina baja y extracto hidroalcohólico  $80,33 \pm 1,14$  mg de Catequina / mL de muestra.

#### **5.4. Actividad antioxidante de la yema terminal de guanábana**

##### **5.4.1. Coeficiente de inhibición del radical DPPH**

##### **5.4.1.1. Coeficiente de inhibición del radical DPPH por unidad fisiográfica y método de extracción**

Los resultados de la capacidad antioxidante de la yema terminal de guanábana para secuestrar los radicales libres de DPPH se expresó por el  $IC_{50}$  (coeficiente de muestra que inhibe el 50% del radical DPPH). La capacidad de inhibir DDPH medido por  $IC_{50}$  por unidad fisiográfica terraza alta (Ta), colina baja (Cb) y montaña alta (Ma), y método de extracción acuosa e hidroalcohólico fueron evaluados mediante el análisis estadístico DCA con un arreglo factorial 3x2 (A-VI) donde se puede observar que existe diferencia altamente significativa ( $P < 0,05$ ) en las unidades fisiográficas, métodos de extracción y la interacción unidad fisiográfica y método de extracción.

En el Cuadro 11 y en la Figura 9 se presenta los valores de la capacidad de inhibir radicales de DPPH de la yema terminal de guanábana y

donde se observan una diferencia entre las unidades fisiográficas y los métodos de extracción aplicados.

En el extracto acuoso, realizado el análisis estadístico se determinó que existe diferencia estadística altamente significativa (A-VIa) y mediante la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ) el mejor tratamiento corresponde a Ta (terrazza alta),  $IC_{50} = 86,712 \mu\text{g/mL}$ ; seguido por los tratamientos Cb (colina baja) y Ma (montaña alta) con  $IC_{50} = 132,874 \mu\text{g/mL}$  y  $IC_{50} = 150,146 \mu\text{g/mL}$  respectivamente. La unidad fisiográfica Ta (Terraza alta) dio el mejor resultado, esto puede explicarse porque su contenido de compuestos antioxidantes, son comúnmente encontrados en hojas, frutos y otros tejidos incluyendo las partes leñosas de tallos y cortezas (LARSÓN, 1998). Así mismo, en suelos con pH altos aumentan ampliamente el aprovechamiento de los nutrientes, pero en unidades fisiográficas (Ma) 1600 m.s.n.m, los suelos tienen pH bajo comparado a la unidad fisiográfica Cb (800 m.s.n.m) y Ta (650 m.s.n.m) tal como indica BIDWELL (1979).

En relación al extracto hidroalcohólico, analizados los resultados estadísticamente (A-VIb), se determinó que existe diferencia significativa, al efectuar la comparación de promedios mediante la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ) se observó que la unidad fisiográfica Cb (colina baja) presentó el mejor resultado ( $IC_{50} = 84,610 \mu\text{g/mL}$ ) es decir, en esta concentración la capacidad de secuestro es más eficiente comparado con los tratamientos en estudio de Ta (terrazza alta) y Ma (montaña alta). Según BRAND *et. al.*, (1995), el  $IC_{50}$  es el coeficiente de inhibición para que un compuesto inhiba el 50 % de los radicales libres DPPH en un tiempo determinado, por ello se puede decir que en la

unidad fisiográfica Cb se encuentra la yema terminal más eficiente. Se ha reportado que la planta obtiene un mayor porcentaje de productos catabólicos definidos, también como productos secundarios (compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, alcaloides, etc.) e inclusive se indica que la más alta pureza de la hoja proviene de suelos arcillosos de colina baja (SALISBURY, 1991; MEZA 1999). Los antioxidantes se definen como aquellas sustancias que, presentes en bajas concentraciones respecto a la de un sustrato oxidable, retardan o previenen la oxidación. Al interactuar con el radical libre, el antioxidante cede un electrón, se oxida y se transforma en un radical libre no tóxico. Según VELÁSQUEZ *et al.* (2004) cuando se incrementa la producción de radicales libres, éstos mecanismos se activan para controlar y estabilizar al ambiente redox intra o extracelular; esto puede deberse, según ROJAS, (1985) a que los suelos arcillosos abastecen a la planta mayor agua durante más tiempo, así mismo la colina baja presenta un mayor porcentaje de materia orgánica.

#### **5.4.1.2. Coeficiente de inhibición del radical DPPH por tratamiento.**

En el Cuadro 12 y en la Figura 10 se muestra los resultados del coeficiente de inhibición del radical DPPH en la hoja terminal de guanábana entre la interacción de la unidad fisiográfica y método de extracción.

Realizando el análisis de varianza se encontró diferencia estadística significativa (A-VII), al comparar los promedios del IC<sub>50</sub> mediante la prueba de Tukey (P<0,05) se encontró que el T4 (Cb y extracto hidroalcohólico) tuvo el mejor IC<sub>50</sub> = 84,610 µg/mL y el más deficiente fue el T6 (Ma y extracto

hidroalcohólico ) con un  $IC_{50} = 164,752 \mu\text{g/mL}$ ; sobre estos resultados se puede indicar que la actividad antioxidante va depender en las plantas de diversos factores, unos son inherentes al mismo vegetal (potencial genético) y otros a factores externos (características del suelo, condición meteorológica y técnicas agronómicas) (KEITH, 1994).

Los extractos hidroalcohólicos contienen mayor concentración de compuestos fenólicos, con porcentaje de taninos condensados de 13 a 16% lo que indica que poseen una considerable proporción de compuestos flavonoides, que les dan un buen potencial para ser considerados como buenos antioxidantes (ROSALES y GONZÁLEZ, 2003).

Así mismo, la polaridad del solvente influye en la extracción de compuestos porque su potencial de donación de hidrógeno depende del número y la posición de grupos hidroxilos y conjugación, así como de la presencia de electrones donadores en el anillo estructural (MONROY *et al.*, 2004).

Con respecto al método de extracción acuoso, éste no dio buen resultado para inhibir el radical DPPH en la hoja terminal de guanábana, esto se debería a que cuando se prepara este extracto se pone la hoja seca en un volumen determinado de agua y se somete a ebullición por 30 minutos. Según GOH *et al.* (2003), la liberación de antioxidantes en hojas aumenta con el tiempo de calentamiento, requiriéndose 15 minutos para la máxima liberación. NAVARRO *et al.* (2006), reporta que durante el procesamiento industrial de los vegetales las operaciones de escaldado, cocción, congelación, secado y

ebullición disminuye el contenido de actividad y biodisponibilidad de los antioxidantes.

La mayor inhibición del radical DPPH de la yema terminal de guanábana fue 84,610  $\mu\text{g/mL}$ , comparado a Sangre de grado (*Corton draconoides Muell. Arg*), en el que PIZARRO (2001) cuantificó 13,26  $\mu\text{g/mL}$ . En extracto acuoso de Orégano (*Limpia graviolens*), KUNTH reporta un  $\text{IC}_{50}$  de 62,5mg/mL. RUÍZ *et al.*, (2006), en Hierba luisa (*Cymbopogon citratos Staph*) reporta un  $\text{IC}_{50}$  de 834,6  $\mu\text{g/mL}$ . ESTRELLA (2002), reportar para el Cedrón (*Aloysia Triphilla*), 329,6  $\mu\text{g/mL}$ ; en el Mata pasto (*Pseudelephantopus spicatus*) el  $\text{IC}_{50}$  de la hoja fue 214,640  $\mu\text{g/mL}$  (VELA, 2008). Como se puede observar, la yema terminal de guanábana tiene buen efecto para inhibir el radical DPPH, esto debido a que los mecanismos de defensa en tejidos vegetales del grupo no enzimático que está formado por tocoferol, carotenoides, ácido ascórbico, glutatión, polifenoles, flavonoides, sustancias nitrogenadas y oligoelementos actúan controlando las especies reactivas del oxígeno (EROS) que son sustancias que dañan a los componentes celulares (MAURICIO *et al.*, 2005).

En conclusión la yema terminal de guanábana que tuvo el mayor coeficiente de inhibición del radical DPPH correspondió a colina baja y extracto hidroalcohólico,  $84,610 \pm 0,64 \mu\text{g/mL}$  y terraza alta y extracto acuoso  $86,712 \pm 0,58 \mu\text{g/mL}$ .

## **5.4.2. Coeficiente de inhibición del radical peroxilo.**

### **5.4.2.1. Coeficiente de inhibición del radical peroxilo por unidad fisiográfica y método de extracción.**

Los resultados del coeficiente de inhibición del radical peroxilo expresado por el  $IC_{50}$  (coeficiente para inhibir el 50% del radical peróxilo), encuentra que existe diferencia estadística altamente significativa ( $P < 0,05$ ) entre las unidades fisiográficas y métodos de extracción.

En el Cuadro 13 y en la Figura 11 se presenta los resultados del coeficiente de inhibición del radical peroxilo expresados por  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) para la yema terminal de guanábana.

Con respecto al extracto acuoso después de realizado el análisis estadístico (A-Villa) se encontró que existe diferencia estadística altamente significativa entre las unidades fisiográficas, aplicando la prueba de significación estadística de Tuckey ( $P < 0,05$ ) se encontró que el mejor tratamiento corresponde a Ta (terrazza alta),  $IC_{50} = 12,722 \mu\text{g/mL}$ , seguido por Cb (colina baja),  $IC_{50} = 19,65 \mu\text{g/mL}$  y el tratamiento más deficiente fue Ma (montaña alta),  $IC_{50} = 21,035 \mu\text{g/mL}$ ; esto puede explicarse porque los metabolitos secundarios son constituyentes de los organismos vegetales, la planta los utiliza cuando hay un ataque de radicales libres como producto de heridas, exceso de calor, metales pesados, quemaduras por frío, etc.; frente a esta acción la planta tiene mecanismos de defensa y actúan en circunstancias que atentan contra la vitalidad de la célula, estos generan respuestas inmediatas para contrarrestar a los agresores y evitar así el daño celular y

puede ser a nivel de lípidos, ácidos grasos, aminoácidos y ácidos nucleicos (LÓPEZ y ECHEVARRI, 2007 ).

Los resultados del análisis de radicales peroxilo en el extracto hidroalcohólico fueron analizados estadísticamente (A-VIIIb) y se encontró diferencia altamente significativa, al comparar las medias del IC<sub>50</sub> mediante la prueba de Tukey (P<0,05) se encontró que Ta (terracea alta) tiene la mayor capacidad de inhibir el radical peróxilo, IC<sub>50</sub> = 11,374 µg/mL, seguido por Cb (colina baja), IC<sub>50</sub> = 14,292 µg/mL y el promedio inferior para inhibir el radical peroxilo correspondió a Ma (montaña alta) cuyo IC<sub>50</sub> = 17,118 µg/mL; esto puede deberse a que el radical peroxilo (ROO·) es el más abundante en los sistemas biológicos. Se origina a partir de la adición del oxígeno prácticamente a cualquier radical hidrocarbonato. Se forman como intermediarios durante la ruptura de los lípidos peroxidados en las reacciones de la peroxidación lipídica: La formación de ROO\* es el paso más importante de las reacciones de propagación en cadena durante la peroxidación lipídica (MUÑOZ, 2007).

#### **5.4.2.2. Coeficiente de inhibición del radical peroxilo por tratamiento.**

En el Cuadro 14 y Figura 12 se muestra los resultados de coeficiente de inhibición del radical peroxilo en la yema terminal de guanábana la interacción de la unidad fisiográfica y métodos de extracción. Realizado el análisis estadístico se encontró que existe diferencia altamente significativo (A-IX) según la comparación de medias de los tratamientos en estudio mediante la prueba de Tukey se encontró que el tratamiento que corresponde a la unidad

fisiográfica de Terraza alta (Ta) y método de extracción hidroalcohólica fue el que tuvo el mejor coeficiente de inhibición del radical peróxilo  $IC_{50} = 11,974$   $\mu\text{g/ml}$ , este extracto hidroalcohólico de la yema terminal de guanábana actúa como un buen antioxidante porque es capaz de inhibir la oxidación de radicales libres así como es capaz de captar radicales de las reacciones de iniciación y/o romper su propagación (POKORNY *et al.*, 2001). El mismo autor afirma que el radical hidroxilo es capaz de atacar los enlaces glucosídicos generando un compuesto estable y un radical alcoxi intermediario muy reactivo. Este intermediario rápidamente sustrae un átomo de hidrogeno del medio, incluso desde peróxido de hidrogeno, en cuyo caso se genera el radical peroxilo. Así, los carbohidratos pueden ser catalizadores de la oxidación de otras moléculas a través de su generación de dicho radical (POKORNY *et al.*, 2001).

El tratamiento que tuvo la menor eficiencia correspondió a la unidad fisiográfica de Ma (montaña alta) y extracto acuoso  $IC_{50} = 21,036$   $\mu\text{g/mL}$ , en todo los tratamientos, el extracto acuoso tiene menos eficiencia para inhibir al radical peroxilo, esto se puede explicar porque la mayor parte de los métodos de la actividad antioxidante miden solamente compuestos solubles en agua debido a la naturaleza hidrofílica de las especies reactivas y de los sustratos oxidables que emplean (PACHÁN *et al.*, 2006).

La actividad antioxidante que ofrece la yema terminal guanábana depende no sólo de las características estructurales como reactividad química hacia los peróxidos y otros especies reactivas, sino también de muchos factores tales como la concentración, la temperatura de la luz, el tipo de

sustrato, el estado físico del sistema y de la presencia de numerosos microcomponentes que pueden actuar como prooxidantes ó sinergista (POKORNY *et al.*, 2001).

De la presente investigación se determinó que el mejor coeficiente de inhibición corresponde a Ta (terraceza alta) y al extracto hidroalcohólico 11,974 µg/mL; en la determinación en cáscara de Camú- Camú al estado pintón VILLANUEVA (2003) encontró 8,30 µg/mL. Evaluando la capacidad antioxidante de seis leguminosas de la selva peruana, en el extracto acuoso de la hoja de *C. paupera* (Herzog). "copaiba", MUÑOZ (2007) encontró 18,231 µg/mL.

En resumen, el coeficiente de inhibición del radical peroxilo por la yema terminal de guanábana corresponde a terraceza alta y extracto acuoso e hidroalcohólico y fue de 12,722 µg/mL ± 0,18 y 11,974±0,02 µg/mL respectivamente.

## VI. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, se llegaron a las siguientes conclusiones:

- La actividad antioxidante de la yema terminal de guanábana (*Annona muricata* L.) en tres unidades fisiográficas de provincia de Leoncio Prado (Terraza alta, Colina baja y Montaña alta), fue variado
- La composición fisicoquímica en promedio en la yema terminal de guanábana expresado en porcentaje fue: humedad:  $76,025 \pm 0,819$ ; proteína: 3,985; grasa: 1,724; ceniza: 1,490; fibra: 4,941; carbohidratos: 11,835, azúcares reductores en base seca:  $5,393 \pm 0,124$ ; azúcares totales:  $9,081 \pm 0,253$ ; sólidos solubles ( $^{\circ}$ Brix):  $1,867 \pm 0,115$  y acidez iónica (pH):  $5,283 \pm 0,029$ .
- El mayor contenido de vitamina C y polifenoles correspondió a la unidad fisiográfica de colina baja y extracto hidroalcohólico:  $0,890 \pm 0,03$  mg AA/100ml de muestra y  $80,33 \pm 1,14$  mg de catequina/ mL de muestra respectivamente.
- Los mejores coeficientes de inhibición ( $IC_{50}$ ) del radical DPPH correspondió a colina baja y extracto hidroalcohólico:  $84,610 \pm 0,64$   $\mu$ g/mL y terraza alta y extracto acuoso  $86,712 \pm 0,58$   $\mu$ g/mL.

- El coeficiente de inhibición de radical peróxilo correspondió a terraza alta y extracto acuoso e hidroalcohólico  $12,722 \mu\text{g/mL} \pm 0,18$  y  $11,974 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$ .
- La yema Terminal de guanábana (*Annona muricata L*) presenta una buena actividad antioxidante.

## VII. RECOMENDACIONES

1. Evaluar la estabilidad de compuestos bioactivos durante el almacenamiento de las yemas terminales de guanábana.
2. Elaborar una bebida con la yema terminal de guanábana como bebida nutracéutica.
3. Investigar otras yemas y hojas de plantas tropicales.
4. Estudiar los compuestos bioactivos de la raíz, hoja y corteza de la guanábana (*Annona muricata* L.).

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AQUINO, R.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C., CONTI, C.; STEIN, M. 1989. Plant metabolites, structure and in vitro antiviral activity of quinovic acid glycosides from *uncaria tomentos* and *guetarda platypoda*. *Journal of natural products*. Vol. 52:679 -685.
- ANDREW, W. 1977. Folin-Ciocalteau Micro Method for Total Phenol in Wine. University of California, Davis.
- ARROYO, A.; PRASHAD, M.; VÁSQUEZ, Y.; LIP, E Y TOMÁS, G. 2005. Actividad citotóxica *in vitro* de la mezcla de *Annona Muricata* y *Krameria Lappacea* sobre células cancerosas de Glándula mamaria, pulmón y sistema nervioso central. *Rev. Perú Med Exp Salud Pública* 22(4).
- ASQUERI, R. 2008. Curso internacional de espectrofotometría. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María. Perú.
- ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMIISTS. 1964. Oficial methods of análisis of AOAC internacional; agricultural chemicals, foods, contaminants and drugs. ISED Gaithersburg Md. USA AOAC internacional. 1141p.
- ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMIISTS. 1997. Oficial methods of análisis of AOAC internacional; agricultural chemicals, foods, contaminants and drugs. V1 y V2 Arlington: AOAC. Inc. 2658 p.

- AVELLO, M.; SUWALSKY, M. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
- BADUI, S. 1984. Química de los Alimentos .Edit. Alambra Mexicana S.A. México. 430 p.
- BADUI, S. 1988. Diccionario de tecnología de los alimentos. Edit. Alambra mexicana, S.A. México. 298 p.
- BRAND, W.; CUVELIER, M; BERSET, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel. Wssenschaft. Und technologie .Estados Unidos.
- BARAHONA, M.1989 LA GUANÁBANA. Escuela de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica. 50 p.
- BARRIGA, R.1997. Plantas Útiles de la Amazonía Peruana”. Concytec.
- BIDWELL, G.1 979. Fisiología vegetal. Editorial ATG S.A. México. 784 p.
- CABREJOS, M. 2000. Radicales Libres [www.ciencia.com/articles/rlibres.html](http://www.ciencia.com/articles/rlibres.html)).
- CAO, Y., CAO, R. 2000. Angiogenesis inhibited by drinking tea. Nature. 398:381.
- CALDERÓN, G. 1992. Cultivo de la guanábana (*Annona muricata*). Problemas fitosanitarios. Fruticultura tropical. Federación Nacional de Cafetaleros de Colombia. Bogotá. p. 227-231.
- CARRETERO, A. 2005. Compuestos fenolicos: Taninos, plantas medicinales. Panorama. Actual Med. 24(2535); 633-636. Medellín- Colombia.
- CAVALCANTE, P. 1991. Frutas comestibles da Amazonia. 5<sup>ta</sup> Edic. CEJUP, Museo Parisense E. Goeldi, Belem. 279 p.

- CHIRINOS, D.; MARÍN, L.; GONZÁLEZ, P.; LARA, C. 2006. Crecimiento y producción de plantas de guayabo (*Psidium guajava* L.) bajo riego e incidencia de frutos enfermos. Centro Frutícola del Zulia -CORPOZULIA. Departamento de Botánica, Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia. Apdo. 15205. Maracaibo, ZU 4005.
- CÓRDOVA, M. 2000. Polifenoles Naturales ([www.personal.readysosf.es/anagelid/espagnol/productos/polifenoles%20naturales.html](http://www.personal.readysosf.es/anagelid/espagnol/productos/polifenoles%20naturales.html)).
- COSTE, R. 1969. El cocotero. Ed. Blume. Madrid- España. 1969 p.
- DAUBENMIRE, R. 1990. Ecología vegetal, tratado de autoecología de plantas 3<sup>ra</sup> Edición. Edit. Limusa S.A. México. 496 p.
- DIPLOCK, A. 1991. Antioxidant Nutrients and disease prevention and Overview Am J. Clin Nutr. 53: 93-189.
- ELEJALDE, Y. 2001. Oxidación entre la vida y An. Med. Interna 18(1):1-4.
- ESPINOZA, R. 1993. Extracción de proteínas de la hoja de kutzú (*pueraria phaseoloides*) para alimentación humana. Tesis industrias alimentarias. UNAS Tingo María Perú. 79 p.
- ESTRELLA, C. 2002. Actividad antioxidante del extracto acuoso de cedrón en diferentes modelos de in Vitro. Tesis ing. en industrias alimentarias. Universidad nacional agraria de la selva .Tingo María- Perú. Pág. 68.
- FENNEMA, O. 1993. Química de los alimentos. Edit. Reverte. Zaragoza. España. 1095 p.
- GARCÍA, N. 2007. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. Universidad Autónoma de Querétaro.

- GEY, F.; BRUBACHER, G.; STAHELIN, H. 1987. Plasma levels of antioxidant vitamins in relation to ischemic heart disease and cancer. *Am J. Clin. Nutr.*; 45: 1368-77.
- GIRALDO, H. 2 000. *Biología Aplicada*. Universidad Agraria de la Selva Tingo María. 331p.
- GOH, L.; BARLOW, P.; YOUNG, C. 2003. Examination of antioxidant activity of *Ginkgo biloba* leaf infusions. *Food Chem.* 82: 275-282.
- GOKMEEN, V.; KAHRAMAN, N.; DEMIR, N.; ACAR, J. 2000. Enzymatically validated liquid chromatographic method for the determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in fruit and vegetables. *Food Engineering Department, Hacettepe University, 06532 Beytepe, Ankara, Turkey*. *Journal of Chromatography A*, 881 (2000) 309–316.
- GONZÁLEZ, M.; BETANCOURT, M.; ORTIZ, R. 2000. Daño oxidativo y antioxidante. *Bioquímica*. 25 (1): 3 – 9.
- GONZÁLEZ. M.; MUÑIZ, P.; VALLS, V. 2001. Actividad antioxidante de la cerveza: estudios in vitro e in vivo. Departamento de biotecnología y ciencia de los alimentos. Universidad de Burgos Y Universidad de Valencia. España.
- GORMAZ, A. 2005. Extracto hidroalcohólico de *bluddleja globosa* y extracto seco de *rosamarinus* officinales como preservante de filetes de *oncorhynchus mykiss*. Optar título de bioquímico. Universidad de Chile de la facultad de ciencia química y farmacéutica, departamento de química y farmacológica y toxicológica, laboratorio de farmacología. Santiago Chile. 38 p.

- HALLIWELL, B. 1989. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol* 70: 737- 757.
- HART, F.; FISHER, H. 1999. Análisis moderno de los Alimentos. Edit. Acribia. Zaragoza. España. 316 p.
- HERNÁNDEZ, M.; PRIETO, A. 1999. Plantas que contienen polifenoles. Antioxidantes dentro del estilo de vida. Centro de Investigaciones Biomédicas. *Rev. Cubana Invest Biomed*; 18(1):12-4.
- HERNÁNDEZ, R.; FERNÁNDEZ C.; BAPTISTA L. 2001. Metodología de la Investigación. Edit. McGraw-Hill interamericana de editores, S.A. México. 503 p.
- HICKS, J.; TORRES, P.; SIERRA, M. 2006. Estrés oxidante. Concepto y clasificación. *Revista de Endocrinología y Nutrición* Vol. 14, No. 4
- KEITH, L. 1994. Ecología, ciencia y política medio ambiental. Edit. Mc Graw-Hill. Colombia. 251p.
- KIRK, R.; SAWYER, R.; EGAN, H. 1996. Composición y análisis de alimentos de pearson. 2da edición. Edit. Continental S.a. México, D.F. Pág. 777
- KORC, I.; BIDEGAIN, M.; MARTELL, M. 1995. Radicales libres, su Implicancia en la patología neonatal. *Rev. Med Uruguay.* 11: 121-135.
- KUSKOSKI, M.; ASUERO, A.; TRONCOSO, A.; MANCINI, J.; FETT, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cienc. Technol. Aliment., Campinas,* 25(4): 726-732.

- LARSÓN, A. 1998. Nutraceuticals and functional food introduction and meaning .j nutr. 16(7/8). 688-689.
- LEHNINGER, L. 1 979. Bioquímica: las bases moleculares de la estructura y función celular. 2da Edición. Edit. Omega S.A. Barcelona Madrid. España. 1117 p.
- LÓPEZ, R.; ECHEVARRI, F. 2007. ¿Son seguros y efectivos los antioxidantes?. Revista scientia et. Technica abria/Vol XIII N° 033; Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira – Colombia. p. 41-44
- MARTÍNEZ, V. 2000. Significado nutricional de los compuestos fenolicos en la dieta ALAN. Vol. 50: p.15-15.
- MARTÍNEZ, S.; GONZÁLEZ, J.; CULEBRAS, M.; TUÑÓN, J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Departamento de Fisiología, Universidad de León y \*Hospital de León. España. Nutr. Hosp. XVII (6) 271-278 ISSN 0212-1611. CODEN NUH0EQ S.V.R. 318*
- MARTÍNEZ, M. 2005. Flavonoides. Dr. En ciencias, facultad de química farmacéutica. Universidad Antioquia. Medellín- Colombia. 76 p.
- MASELLI, A.; ROSALES, L.; GUEVARA, Y. 2006. Uso de extractos vegetales sobre *Xanthomonas phaseoli*, causante de la quemazón en *Phaseolus vulgaris* L. INIA-CENIAP, Unidad de Protección Vegetal Maracay, Venezuela. Revista Digital CENIAP HOY N° 12. ISSN: 1690-4117.
- MAURICIO, V.; RIVERA, C.; NARVÁEZ C. 2005. Capacidad antioxidante durante la maduración de Arazá (*Eugenia stipitata* Me Vaugh). revista Colombiana de Química. Vol. 34, N° 1. Colombia

- MELCHOR, S. 2004. Procesamiento tecnológico para la obtención de té verde (*camellia simensis*): Determinación de su actividad antioxidante y cuantificación de flavonoides por HPLC. Tesis para optar el título de Ing. En ingeniero en Industrias Alimentarias. Universidad Nacional Agraria de la Selva .Tingo María-Perú. 69 p.
- MEZA, N. 1999. Desarrollando nuestra biodiversidad cultural” sangre de grado” y reto de su producción sustentable en el Perú. Lima – Perú . 225 p.
- MOHD, Z.; ABDUL-HAMID; OSMAN, A. 2001. Antioxidative activity of extracts from mengkudu (*Morinda Citrifolia* L.) root, fruit and leaf. Department of science, faculty of food science and biotechnology, university putra Malaysia, UPM 43400, serdang, selangor, Malaysia
- MONROY, V.; TOTOSAUS, A.; GARCÍA, M. 2004. Extracción de polifenoles de chile ancho y romero a diferentes concentraciones de etanol: agua. Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec. Estado de México-México. e: mail. [dr\\_igm@yahoo.com.mx](mailto:dr_igm@yahoo.com.mx)
- MUÑOZ, M. 2007. Valoración del esfuerzo realizado distintos tipos de ejercicios mediante la medición de estrés oxidativa y el perfil esteroideo urinario. Universidad de Extremadura servicio de publicaciones. España. 127 p.
- MUÑOZ, S. 2007. Capacidad Antioxidante En Seis Leguminosas De La Selva Peruana. Tesis para optar el título de Ing. En ingeniero en recursos naturales renovables mención forestal. Universidad Nacional Agraria de la Selva .Tingo María-Perú. 78 p.
- MURRAY, L. 2001. Bioquímica de Harper, 15va Edición. Ed. Acribia. S. A. Madrid España 1528 p.

MURILLO, E.; LOMBO, O.; TIQUE, M.; MÉNDEZ, J. 2007. Potencial oxidante de *Bauhinia Kalbreyeri Harms* (FABACEAE). Universidad Del Tolima, facultad de ciencias, departamento de química, grupo de investigación de productos Naturales, Departamento de Biología y Ibaqué. Vol. 18. N°6. Tolima – Colombia. p. 12-56.

NAVARRO, A.; PINOTTI, A.; GARCÍA, M.; MARTINO, M. 2006. Determinación de la capacidad antioxidante de extractos vegetales sometidos a distintos procesos de conservación. CIDCA. Fac. de Ciencias Exactas. UNLP, La Plata (1900). Fac.de Ingeniería. UNLP. Argentina. e-mail: [albanavarro@yahoo.com.a](mailto:albanavarro@yahoo.com.a). AAIQ Asociación Argentina de Ingenieros Químicos y IACCHE – Interamerican Confederation of Chemical Engineering.

[http://dpi.eq.ufri.br/ciaiq\\_22/CD/formCrCongreso/papers/14b/14b\\_439.pdf](http://dpi.eq.ufri.br/ciaiq_22/CD/formCrCongreso/papers/14b/14b_439.pdf).

NÚÑEZ, C. 2002. Distribución radial de polifenoles en troncos de *Eucalyptus grandis*. Congreso iberoamericana de celulosa y papel (CIADCYP). [ce\\_nuñez@fceqyn.unam.edu.ar](mailto:ce_nuñez@fceqyn.unam.edu.ar)

ORDOÑEZ, G. 1987. Obtención de um concentrado protéico a partir de hojas de yuca (*Manihot Esculenta, Grantz*) y su aplicación. Tesis Industrias Alimentarias Universidad Nacional Agrária de La Selva. 88 p.

PACHÁN, S.; VILLANO, D.; TRONCOSO, A.; GARCÍA, C. 2006. Capacidad para absorber radicales de oxígeno (ORAC) y secuestro a radical peróxilo (ROO\*). Facultad de farmacia, universidad de Sevilla- España. Revista de archivos latinoamericana de nutrición Venezuela. Vol. 56. N°

- PÉREZ, T. 2003. Flavonoides; antioxidantes o prooxidantes. Instituto de ciencias básicas y pre clínicas "Victoria de Girón". Centro de investigaciones biomédicas. Rev. Cubana Invest Biomed: 22(1):48-57
- PIETTA, P. 2000. Flavonoides and antioxidants. J. Natur. Prod. 63:1035-1042.
- PIZARRO, U. 2001. Caracterización de látex de sangre de grado (*cortón draconoidemuell: arg*) de árboles de diferentes pisos ecológicos. Ing. En industrias alimentarias. Universidad nacional agraria de la selva. Tingo María –Perú. 98 p.
- PRIMO, Y. 1997. Química Agrícola: alimentos. Edit. Alambra S.A. Madrid. España. 478p.
- POKORNY, J.; YANISHLEIVA, N.; GORDON, M. 2001. Antioxidantes de los alimentos: practicas aplicaciones. Edit. Acribia Zaragoza España. 423 p.
- POLYAKOV, N. ; LESHINA, T. ; KONOVALOVA, T. ; KISPERT, L. 2001. Carotenoids as scavengers of free radicals in fenton reaction. Antioxidants or pro-oxidants. J. Free. Rad. Biol. e Med. 31 (3): 398 – 404.
- QUISPE, A.; ZAVALA, D.; POSSO, M.; ROJAS, J.; VAISBERG, A. 2007. Efecto citotóxico de *Annona muricata* (guanábana) en cultivo de líneas celulares de adenocarcinoma gástrico y pulmonar Sociedad Científica de San Fernando. Lima, Perú. Vol. 12 N° 1.
- RAMOS, E. 2005. Evaluación de la capacidad antioxidante del matico en el trópico. Tesis de grado de maestro en ciencias agronómicas. Universidad nacional agraria de la selva .Tingo María- Perú. 86 p.
- RAMOS, M.; IBARRA BATISTA.; GÓMEZ, B.; ZAMORRA, L. 2006. Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. Vol. VIII N° 1.

- REILLY, P.; BULKLEY, G. 1990. Tissue injury by free radicals and other toxic oxygen metabolites, *Br J Surg* 77
- REÁTEGUI, D. 2003. Caracterización físico química y actividad antioxidante del agua de dos variedades de coco (*cocos nucifera L.*). Tesis Ing. En Industrias Alimentarias. Tingo María. Universidad Nacional Agraria de la Selva. 78 p.
- RITCHEY, F. 2002. Estadística para las ciencias sociales .edit. McGraw-Hill/interamericana editores, S.A. 609 p.
- ROJAS, M. 1985. Fisiología vegetal aplicado. 3ª edición. Edit. Mc Graw - Hill. México 300 p.
- ROSALES, C.; GONZÁLEZ, L. 2003. Comparación del Contenido de Compuestos Fenólicos en la Corteza de Ocho Especies de Pino. Artículo investigación. p. 16-47.
- RUIZ, I. 2004. "Actividad antioxidante, Polifenoles totales en el extracto acuoso de hierba luisa (*Cympogogan citratus Staph*), y su estabilidad en bebidas modelo". Tesis para optar el título de Ing. En industrias alimentarias. Tingo María-Perú. 78 p.
- RUIZ, M.; MENDOZA, D.; ZAVALA, N. 2006. Determinación de Compuestos fenólicos de tres poblaciones de orégano (*Lippia graveolens Kunt*). Universidad autónoma de queretano. Facultad de ciencias naturales. Facultad de química/ programa posgrado en alimentos del centro de la república/ maestría en ciencias y tecnología de alimentos. México, <http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-VII/UAQ%20Ruiz%20Maqueda.doc6>

- SANDOVAL, J.; L. MULLER. 1989. Consideraciones sobre la conservación *in vitro* de Musáceas; posibilidades y limitaciones. ASBANA 13: 21-24.
- SANDOVAL, M.; OKUHAMA, N.; ÁNGELES, F. 2001. Técnicas de investigación para determinar la actividad antioxidante y anti- inflamatoria de plantas medicinales de la amazonia. 1<sup>st</sup> international workshop. Iquitos- Perú
- SANTOS, B. 2001. Implicaciones en la salud de los polifenoles de la dieta. Universidad de salamanca, departamento de química analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia. Salamanca – España. e-mail: [csb@usal.es](mailto:csb@usal.es)
- SALISBURY, F. 1991. Fisiología vegetal de las plantas. 2º Edición Paraninfo. España. 523 p.
- SIES, H. 1997. Antioxidants in disease mechanisms and therapy. Vol. 38. USA. Academia Press Inc. 293.
- TELLO, Z. 2008. Determinación de la capacidad antioxidante y contenido total de polifenoles de los extractos acuosos y metanolicos de hojas y corteza de *trema micrantha* blume (atadijo). Práctica pre profesional en recursos naturales renovables. Universidad nacional agraria de la selva .Tingo María- Perú. 86 p.
- TREVIÑO, N.; ORANDA, C.; RIVAS, M.; VERDE STAR, M.; NÚÑEZ, G.; MORALES, R. 2006. Potencial antioxidante en cactáceas. Fac. de Ciencias Biológicas .UANL Pedro de Alba S/N Ciudad Universitaria. CP 66451. [jneavez@hotmail.com](mailto:jneavez@hotmail.com).
- THOMAS, M. 2000. The Role of free radicals and antioxidant Nutrition Volume 16. numbers 718.

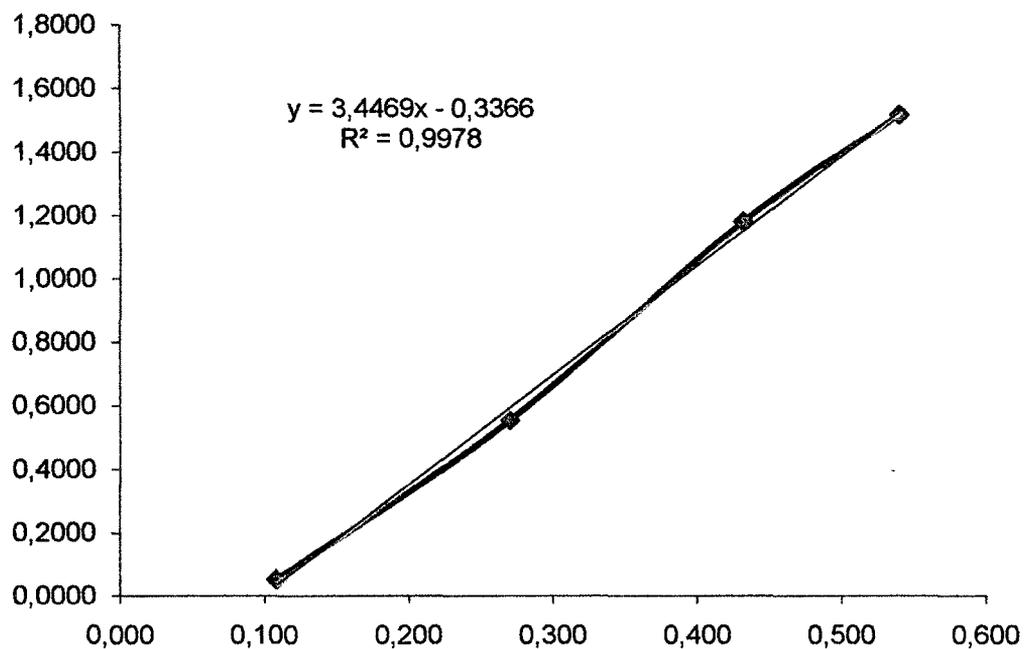
- TUR. J., 2004. Los antioxidantes en la Dieta Mediterránea. Laboratorio de Ciencias de actividad Física Universidad de les Illes Balears. Rev Esp Nutr Comunitaria; 10(4):198-207.
- VASCONCELLOS, A. 2000. Alimentos Funcionales conceptos para la salud. Institute Food Techohology (ITF). California USA. 15 p.
- VELÁSQUEZ, P. M.; PRIETO, G.; CONTRERAS, P. 2004. El envejecimiento y los radicales libres. Ciencias 75 Julio -Setiembre. México. p. 37-43.
- VEGA, D. 2001. Elaboración de harina de hoja erythrina (*Erythrina Edullis*) para alimentación humana. Tesis ingeniero en industrias alimentarias, UNAS, Tingo María Perú. 67 p.
- VELA, R. 2008. Determinó la capacidad antioxidante mediante el método DPPH del *Pseudelephantopus spicatus*. Práctica pre profesional en industrias alimentarias. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María- Perú. 76 p.
- VENEREO, G. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Instituto Superior de Medicina Militar "Dr. Luis Díaz Soto". Rev. Cubana Med Milit 2002; 31(2):126-33.
- VILLACHICA, H. 1996. Frutales y Hortalizas Promisorias de la Amazonía. Tratado de Cooperación Amazónica. Secretaría pro-tempore. Lima - Perú.
- VILLEGAS. O.; AYALA, Z.; CRUZ, V.; HERNÁNDEZ, J.; GONZÁLEZ, A. 2005. Efecto antioxidante de extractos naturales en manzana Red Deliciosos. Simposium "Nuevas tecnologías de conservación y envasado de frutas y hortalizas. Vegetales frescos cortados" La Habana, Cuba.

- VILLANUEVA, T. 2003. Antocianinas, Acido Ascórbico ó Polifenoles Totales y Actividad Antioxidante en la Cáscara de Camú- Camú. Tesis Ing. en industrias alimentarias. Universidad nacional agraria de la selva .Tingo María- Perú. 68 p.
- YAMAGUCHI, T. ; TAKAMUR, H. ; MATOBA, T. ; TERAQ, J. 1998. HPLC Method for Evaluation of Free Radical – Scavenging activity of foods by using 1,1 Diphenyl - 2 – Picrylhydrazyl Biosci. Biotechnol. Biochem. 62 (6): 1201 – 1204.
- ZHAO, J., WANG, J.; CHEN, Y.; AGARWAL, R. 1999. Anti-tumor-promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two-stage initiation-promotion protocol and identification of procyanidin B5-3'-gallate as the most effective antioxidant constituent. Carcinogenesis, 20 (9), 1737-1745.
- ZÚÑIGA, M. 2005. Caracterización de fibra dietaría en orujo y capacidad antioxidante en vino, hollejo y semilla de uva. Ing. ciencias agrarias facultad de ciencias agrarias. Universidad de chile. 68 p.

**ANEXO**

A-i. Cuadro de Absorbancia de la concentración de glucosa para la cuantificación de azúcares reductores

Concentración (mg glucosa)	Absorbancia
0,108	0,0635
0,270	0,4978
0,432	1,0318
0,540	1,3216



Curva estándar de glucosa para la cuantificación de azúcares reductores.

A-II: Análisis de varianza cuantificación de vitamina C (mg. Ácido ascórbico/ml muestra) de la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica por extractos.

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tratamiento	5	1,44926511	0,28985302	96,60	* *
Niveles	2	1,44046011	0,72023006	240,03	* *
Extracto	1	0,00259200	0,0025920	0,86	0,3710
Interacción(A*B)	2	0,00621300	0,00310650	1,04	0,3848
Error experimental	12	0,03600667	0,00300056		
Total	17	1,48527178			

$R^2=0,975758$  CV = 9,143100 MSE= 0,054777 Media =0,599111

A-IIa.- Análisis de varianza de vitamina C (mg. Acido ascórbico/ml muestra) de la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica y extracto acuoso.

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tratamiento	2	0,63173956	0,31586978	104,33	**
Error experimental	6	0,01816533	0,00302756		
Total	8	0,64990489			

$R^2= 0,972049$  CV = 9,00380 MSE=0,055023 Media =0,611111

A- IIb.- Análisis de varianza de vitamina C (mg. Acido ascórbico/ml muestra) de la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica y extracto hidroalcohólico.

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tratamiento	2	0,81493356	0,40746678	137,03	**
Error experimental	6	0,01784133	0,00297356		
Total	8	0,83277489			

$R^2=0,978576$  CV = 9,28790 MSE= 0,05453 Media = 0,5871

A-III.- Análisis de varianza de vitamina C (mg. Acido ascórbico/ml muestra) de la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica y extracto.

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tratamiento	5	1,44926511	0,28985302	96,60	**
Error experimental	12	0,03600667	0,00300056		
Total	17	1,48527178			
R <sup>2</sup> =0,975758    C V =0,975758    MSE= 9,143100    Media=0,599111					

A-IV.- Análisis de varianza cuantificación polifenoles totales (mg. cateq./ml muestra) de la yema Terminal de guanábana por unidad fisiográfica por extractos.

Fuente	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tratamiento	5	9741,75892	1948,35178	106,16	**
Nivel	2	7475,097449	3737,548725	203,64	**
Extracto	1	939,818098	939,818098	51,21	**
Interacion(A*B)	2	1326,843374	663,421687	36,15	**
Error experimental	48	880,97469	18,35364		
Total	53	10622,73361			
R <sup>2</sup> =0,911    C Var =7,300    R MSE=4,284    Media =58,686					

A- IVa- Análisis de varianza cuantificación polifenoles totales (mg. cateq. /ml muestra) de la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica y extracto acuoso.

Fuente de variación	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tratamiento	2	1251,6801	625,8400	24,60	**
Error	24	610,6462	25,4436		
Total	26	1862,3263			
R <sup>2</sup> = 0,6721    CV = 9,2520    SEM = 5,0442    Media = 54,5136					

A- IVb- Análisis de varianza cuantificación polifenoles totales (mg. cateq. /ml muestra) de la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica y extracto hidroalcohólico.

Fuente de variación	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tratamiento	2	7550,2607	3775,1304	335,16	**
Error	24	270,3285	11,2637		
Total	26	7820,5892			
R <sup>2</sup> = 0,9654    CV = 5,3393    SEM = 3,3561    Media = 62,8573					

A- V- Análisis de varianza cuantificación polifenoles totales (mg. cateq. /ml muestra) de la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica.

Fuente de variación	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tratamiento	5	9741,75892	1948,35178	106,16	**
Error	48	880,97469	18,35364		
Total correcto	53	10622,73361			
R <sup>2</sup> = 0,9171    CV = 7,3001    SEM = 4,2841    Media = 58,6855					

A- VI.- Análisis de varianza del IC<sub>50</sub> del radical DPPH de la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica por extractos (factorial).

Fuente de variación	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tratamiento	5	56169,4303	11233,8861	2539,56	**
nivel	2	44668,1509	22314,0754	5044,37	**
Extracto	1	1259,3935	1259,3935	284,70	**
Interacción (AB)	2	10281,1858	5140,9492	1160,11	**
Error experimental	48	212,3308	4,4435		
Total	53	56381,7612			
R <sup>2</sup> = 0,9962    CV = 1,7761    SEM = 2,1032    Media = 118,4149					

A-VIa.- Análisis de varianza del IC<sub>50</sub> del radical DPPH de la yema Terminal de guanábana por unidad fisiográfica y extracto acuoso.

Fuente de variación	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tratamiento	2	19359,733	192,329	2346,550	**
Error	24	99,003	4,125		
Total	26	19458,727			
R <sup>2</sup> = 0,994    CV = 1,6479    SEM = 2,031    Media = 123,240					

A- VIb.- Análisis de varianza del IC<sub>50</sub> del radical DPPH de la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica y extracto hidroalcohólico.

Fuente de variación	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tratamiento	2	35550,3129	17775,156	3764,350	**
Error experimental	24	113,3274	4,721		
Total	26	35663,640			
R <sup>2</sup> = 0,996    CV = 1,913    SEM = 2,173    Media = 113,585					

A-VII- Análisis de varianza del IC<sub>50</sub> del radical DPPH de la yema terminal de guanábana.

Fuente de variación	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tratamiento	5	56169,43033	11233,88607	2539,56	**
Error experimental	48	212,33089	4,42356		
Total	53	56381,76122			

R<sup>2</sup> = 0,9962      C V = 1,7762      SEM= 2,0103      Media= 118,4149

A- VIII.- Análisis de varianza del IC<sub>50</sub> del radical peróxilo de la hoja terminal de guanábana por unidad fisiográfica por extractos.

Fuente de variación	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tratamiento	5	675,1928	135,0386	260,69	**
niveles	2	468,6070	234,3035	452,33	**
Extracto	1	169,3926	169,3926	327,01	**
Interacción (AB)	2	37,1931	19,5965	35,90	**
Error experimental	48	24,8638	0,5179		
Total	53	700,0566			

R<sup>2</sup> = 0,9644      CV = 4,4886      SEM = 0,7197      Media = 16,0342

A-VIIIa.- Análisis de varianza del IC<sub>50</sub> del radical peróxilo de la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica y extracto acuoso.

Fuente de variación	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tratamiento	2	357,3314	178,665	184,40	**
Error	24	23,2534	0,968		
Total	26	380,5848			

R<sup>2</sup> = 0,9389      CV = 5,5282      SEM = 0,9843      Media = 17,8053

A- VIIIb.- Análisis de varianza del IC<sub>50</sub> del radical peróxilo de la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica y extracto hidroalcohólico.

Fuente de variación	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tratamiento	2	148,4687	74,2343	11,0631	**
Error experimental	24	1,6104	0,067		
Total	26	150,0712			
$R^2 = 0,9892$		CV = 1,5161	SEM = 0,9590	Media = 14,2631	

A-IX- Análisis de varianza del  $IC_{50}$  del radical peróxido de la yema terminal de guanábana por unidad fisiográfica y extracto.

Fuente de variación	GL	SC	CM	FC	Sig.
Tratamiento	5	675,1928	135,0385	260,69	**
Error experimental	48	24,8638	0,5179		
Total	53	700,0566			
$R^2 = 0,9644$		CV = 0,4886	SEM = 0,7197	Media = 16,034	